

English Abstract for JP 2003-521219

**Humanized monoclonal antibodies against Shiga toxins, useful for protection against enterohemorrhagic Escherichia coli or other Shiga toxin producing bacteria**

Patent Assignee: JACKSON FOUND ADVANCEMENT MILITARY MED (JACK-N); SUNOL MOLECULAR CORP (SUNO-N); MELTON-CELSA A (MELT-I); O'BRIEN A D (OBRI-I); SCHMITT C K (SCHM-I); STINSON J L (STIN-I); WONG H (WONG-I); OBRIEN A D (OBRI-I); STINSON J R (STIN-I)

Inventor: MELTON-CELSA A; O'BRIEN A D; SCHMITT C K; STINSON J L; WONG H; OBRIEN A D; STINSON J R

Number of Countries: 023 Number of Patents: 006

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9932645	A1	19990701	WO 98US27267	A	19981222	199935 B
AU 9920902	A	19990712	AU 9920902	A	19981222	199950
EP 1042492	A1	20001011	EP 98965434	A	19981222	200052
			WO 98US27267	A	19981222	
<b>JP 2003521219</b>	<b>W</b>	<b>20030715</b>	<b>WO 98US27267</b>	<b>A</b>	<b>19981222</b>	<b>200347</b>
			JP 2000525563	A	19981222	
AU 764091	B	20030807	AU 9920902	A	19981222	200362
US 20030170248	A1	20030911	US 9768635	P	19971223	200367
			US 98215163	A	19981218	

Abstract (Basic): WO 9932645 A1

NOVELTY - Humanized monoclonal antibodies (MAb) (I) against Shiga toxins are new.

DETAILED DESCRIPTION - A humanized MAb that binds to Shiga toxin comprises a constant and a variable region, where:

- (a) the constant region contains at least part of a human immunoglobulin (Ig) constant region; and
- (b) the variable region contains at least part of a non-human Ig variable region.

INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

- (1) a fragment of an antibody as above where the fragment binds Shiga toxin type I or II;
- (2) an expression vector comprising a DNA sequence encoding (I); and
- (3) a host cell transformed with (2).

ACTIVITY - Antibacterial; Immunoprotective.

MECHANISM OF ACTION - Antibody; Vaccine.

USE - Host cells transformed with vectors encoding a humanized MAb against Shiga toxin type 2 is useful for treating a patient with an infection caused by enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) or other Shiga toxin producing bacteria. The humanized MAb can also be used to reduce illness caused by EHEC or other Shiga toxin producing bacteria (all claimed).

EHEC are associated with food-borne outbreaks of bloody diarrhea (hemorrhagic colitis) and the hemolytic uremic syndrome. In particular, the humanized MABs ameliorate edema, thrombocytopenia and uremia associated with EHEC-mediated disease.

2003-521219



PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification <sup>6</sup> : <b>C12N 15/85, C07K 16/12, 16/46, C12N 5/10, A61K 39/40</b>		<b>A1</b>	(11) International Publication Number: <b>WO 99/32645</b>
			(43) International Publication Date: <b>1 July 1999 (01.07.99)</b>
(21) International Application Number: <b>PCT/US98/27267</b>		(81) Designated States: AU, CA, JP, European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) International Filing Date: <b>22 December 1998 (22.12.98)</b>		<b>Published</b> <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>	
(30) Priority Data: 60/068,635      23 December 1997 (23.12.97)      US 09/215,163      18 December 1998 (18.12.98)      US			
(71)(72) Applicants and Inventors: STINSON, Jeffrey, L. [US/US]; 15030 Durham Lane, Davie, FL 33331 (US). WONG, Hing [US/US]; 2966 Wentworth, Weston, FL 33332 (US). O'BRIEN, Alison, D. [US/US]; 5514 Charlote Road, Bethesda, MD 20817 (US). SCHMITT, Clare, K. [US/US]; 4616 Glasgow Drive, Rockville, MD 20853 (US). MELTON-CELSA, Angela [US/US]; 20516 Brandywine Court, Sterling, VA 20165 (US).			
(74) Agents: GARRETT, Arthur, S. et al.; Finnegan, Henderson, Farabow, Garrett & Dunner, L.L.P., 1300 I Street, N.W., Washington, DC 20005-3315 (US).			

(54) Title: HUMANIZED MONOCLONAL ANTIBODIES THAT PROTECT AGAINST SHIGA TOXIN INDUCED DISEASE

(57) Abstract

The present invention describes the preparation and use of biologically and immunologically active humanized monoclonal antibodies to Shiga toxin, a toxin associated with HC and the potentially life-threatening sequela HUS transmitted by strains of pathogenic bacteria. The present invention describes how these humanized antibodies may be used in the treatment or prevention of Shiga toxin induced diseases. One aspect of the invention is the humanized monoclonal antibody which binds Shiga toxin where the constant regions are IgG1-kappa and the variable regions are murine in origin. Yet another aspect of the invention is expression vectors and host cells transformed with such vectors which express the humanized monoclonal antibodies of the present invention.

13C4 ANTI-STX1 HEAVY CHAIN VARIABLE REGION

```

CAGGTGCAGCTCCAGGAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCTCGGGGCTCACTGAGGATG SEQ ID NO.18
Q V Q L Q E S G A E L V R S G A S V R M SEQ ID NO.19
TCCTGCAAGGCTTCGGCTACACATTTACAGTTACAAATATGCACTGGGTAACAGACA
S C D A S G Y T F T S Y H N H W V K Q T
CCTGGCAGGGGCTGGAATGGATGGATATTTATCTGGAATGGTGGTACTACTAC
P G Q G L E W I G Y I Y P G N G G T N Y
ATTCAGAAATTTAAGGGCAAGGCCATATTGACTGCAGACATCTCCAGCACAGCTAC
I Q K F K G K A I L T A D T S S S T A Y
ATGCAGATCAGCAGTCTGACATCTGAAGACTCTGGGCTATTTCTGTACAAGAGTCCCTCT
N Q I S S L T S E D S A V Y F C T R S P S
CACTACAGTAGTGAACCTTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACTCTCACAGTCTCTCA
H Y S S D P Y P D Y W G Q G T T L T V S S
  
```

13C4 ANTI-STX1 LIGHT CHAIN VARIABLE REGION

```

GATATGCTGAGTCCAGTCTCAAAATTCATGTCCACATCACTGGAGACAGGGTCAAGATC SEQ ID NO.20
D I V M S Q S H K P M S T S V G D R V S I SEQ ID NO.21
ACCTGTAAGGCCAGCCAGGATGTGGGACTGCTGTGCTGCTATCAGCAGATCCAGGACAA
T C K A S Q D V G T A V A W Y Q Q N P G Q
TCCTCAAAATTTCTGATTTACTGGGCAATCCACAGGCACTGAGTCCCTGATCGCTTACA
S P K P L I Y W A S T R H T G V P D R P T
GGCAGTGAATCTGGGACAGATTTCACTCTCAACATTTACCAATGCACTGCAAGACTGGCA
G S G S G T D P T L T I T H V Q S E D L A
GATTAATTTCTGCAACAAATATAGCAGTTATCTCTCACGTTGCGTGGGACCACTGAGG
D Y F C Q Q Y S S Y P L T P G A G T S L E
CTGAACCT
L K R
  
```

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-521219

(P2003-521219A)

(43) 公表日 平成15年7月15日 (2003.7.15)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>  
C 1 2 N 15/09  
A 6 1 K 39/395  
39/40  
A 6 1 P 1/04

識別記号  
Z N A

F I  
A 6 1 K 39/395

テ-マ-ト (参考)

N 4 B 0 2 4  
M 4 B 0 6 4

39/40

4 B 0 6 5

A 6 1 P 1/04

4 C 0 8 5

31/04

4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-525563(P2000-525563)  
(86) (22) 出願日 平成10年12月22日 (1998.12.22)  
(85) 翻訳文提出日 平成12年6月23日 (2000.6.23)  
(86) 国際出願番号 PCT/US 98/27267  
(87) 国際公開番号 WO 99/032645  
(87) 国際公開日 平成11年7月1日 (1999.7.1)  
(31) 優先権主張番号 60/068, 635  
(32) 優先日 平成9年12月23日 (1997.12.23)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(31) 優先権主張番号 09/215, 163  
(32) 優先日 平成10年12月18日 (1998.12.18)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 スティンソン, ジェフリー, エル.  
アメリカ合衆国 33331 フロリダ州, ダ  
ヴィー, ダーハム レーン 15030  
(71) 出願人 ウォン, ヒング  
アメリカ合衆国 33332 フロリダ州, ウ  
エストン, ウェントワース 2966  
(71) 出願人 オブライエン, アリソン, ディー.  
アメリカ合衆国 20817 メリーランド州,  
ベテスダ, チャールコート ロード 5514  
(71) 出願人 シュミット, クレア, ケー.  
アメリカ合衆国 20853 メリーランド州,  
ロックビル, グラスゴー ドライブ 4616  
(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 志賀毒素誘発性疾患を防御するヒトモノクローナル抗体

(57) 【要約】

本発明では、志賀毒素(病原性細菌株によって伝染するE  
Cおよび生命を脅かす危険性のある続発症であるHUSに関  
連する毒素)に対する生物学的および免疫学的に活性な  
ヒトモノクローナル抗体の調製および使用を記載す  
る。本発明では、志賀毒素誘発性疾患の治療または予防  
において、これらのヒト化抗体をどのように使用し得る  
かを記載する。本発明の1つの態様は、志賀毒素に結合  
するヒトモノクローナル抗体であって、定常領域がIg  
G1- $\kappa$ であり、可変領域がマウスを起源とするものであ  
る。本発明の別の態様は、本発明のヒトモノクローナ  
ル抗体を発現する発現ベクター、およびこのようなベク  
ターで形質転換された宿主細胞である。

13C4 抗 STX1 H 鎖可変領域

CAGTCCAGCTCCAGAGCTGCGGCTGACAGCTGACCTGCGGCTCAGTCCAGAGCT  
QVQLQESGAEFLYRSGASVRN  
TCTGCAAGCTTCTGCGGCTGACAGCTGACCTGCGGCTCAGTCCAGAGCT  
SCDAAGCTTCTGCGGCTGACAGCTGACCTGCGGCTCAGTCCAGAGCT  
CCGAGAGCTTCTGCGGCTGACAGCTGACCTGCGGCTCAGTCCAGAGCT  
PCGGLPWHIGYLLPSSGGTHY  
ATTCAGAGCTTCTGCGGCTGACAGCTGACCTGCGGCTCAGTCCAGAGCT  
IQEPLGKAILLPADTSSSSAY  
ATTCAGAGCTTCTGCGGCTGACAGCTGACCTGCGGCTCAGTCCAGAGCT  
EQISSSLTSSDSAVFPCTRPSS  
CAGTCCAGAGCTTCTGCGGCTGACAGCTGACCTGCGGCTCAGTCCAGAGCT  
HTSSDPYEDIVGQGTTLETSSS

配列番号 15  
配列番号 19

13C4 抗 STX1 L 鎖可変領域

CGAGTCCAGCTCCAGAGCTGCGGCTGACAGCTGACCTGCGGCTCAGTCCAGAGCT  
DIVNSQSSEKPNSTGVGDRVSI  
ATTCAGAGCTTCTGCGGCTGACAGCTGACCTGCGGCTCAGTCCAGAGCT  
TCTCAASDPVGTAVAVTQQRPQQ  
TCTCAAGCTTCTGCGGCTGACAGCTGACCTGCGGCTCAGTCCAGAGCT  
SFKFLIYEAETTERIGVDPDFT  
CGAGTCCAGCTCCAGAGCTGCGGCTGACAGCTGACCTGCGGCTCAGTCCAGAGCT  
GSGSGTDFTLTITHTVQSRDLA  
GATTTCTTCAAGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCT  
DYFCQQYSSYPLPTFCAGYSLE  
CTGAGCT  
GKR

配列番号 20  
配列番号 21

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 定常領域と可変領域を含む、志賀毒素タンパク質に結合するヒト化モノクローナル抗体であって、前記定常領域がヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含み、前記可変領域が非ヒト免疫グロブリンの可変領域の少なくとも一部を含む、前記ヒト化モノクローナル抗体。

【請求項2】 マウス13C4(ATCC受託番号CRL 1794)、マウス11E10(ATCC受託番号CRL 1987)、ヒト化13C4(H13C4)、およびヒト化11E10(H11E10)からなる群より選択される抗体と同様の結合特異性を有する、請求項1記載のヒト化モノクローナル抗体。

【請求項3】 志賀毒素1型に結合する、請求項1記載のヒト化モノクローナル抗体。

【請求項4】 前記非ヒト可変領域がマウス由来のものである、請求項3記載のヒト化モノクローナル抗体。

【請求項5】 前記可変領域の少なくとも一部が図3に記載の配列(配列番号19および配列番号21)由来のものである、請求項3記載のヒト化モノクローナル抗体。

【請求項6】 志賀毒素1型に結合する、請求項3記載の抗体のフラグメント。

【請求項7】 前記ヒト定常領域がIgG、IgAおよびIgMからなる群より選択される、請求項3記載のヒト化モノクローナル抗体。

【請求項8】 前記ヒト定常領域がIgGである、請求項7記載のヒト化モノクローナル抗体。

【請求項9】 定常領域と可変領域を含む、志賀毒素1型に結合するヒト化モノクローナル抗体であって、前記定常領域がIgG1- $\kappa$ であり、前記可変領域が図3に記載の配列(配列番号19および配列番号21)の少なくとも一部を含む、前記ヒト化モノクローナル抗体。

【請求項10】 定常領域と可変領域を含む、志賀毒素1型に結合するヒト化モノクローナル抗体であって、前記定常領域がIgG1- $\kappa$ であり、前記可変領域が図3に記載のCDR配列の少なくとも一部を含み、前記CDR配列が以下の位置にあ

る、前記ヒト化モノクローナル抗体：

H鎖CDR(配列番号19)：CDR1-aa31-35、CDR2-aa50-66、CDR3-aa99-111

L鎖CDR(配列番号21)：CDR1-aa24-34、CDR2-aa50-56、CDR3-aa89-97。

【請求項11】 請求項9記載の抗体のL鎖およびH鎖の可変領域と定常領域をコードするDNA配列を含んでなる発現ベクターであって、前記可変領域のコード配列が図3に記載のDNA配列(配列番号18および配列番号20)の少なくとも一部を含む、前記発現ベクター。

【請求項12】 請求項11記載の発現ベクターで形質転換した宿主細胞。

【請求項13】 志賀毒素2型および志賀毒素2型変異体に結合する、請求項1記載のヒト化モノクローナル抗体。

【請求項14】 前記非ヒト可変領域がマウス由来のものである、請求項13記載のヒト化モノクローナル抗体。

【請求項15】 前記可変領域の少なくとも一部が図6に記載の配列(配列番号42および配列番号44)由来のものである、請求項13記載のヒト化モノクローナル抗体。

【請求項16】 志賀毒素2型および志賀毒素2型変異体に結合する、請求項13記載の抗体のフラグメント。

【請求項17】 前記ヒト定常領域がIgG、IgAおよびIgMからなる群より選択される、請求項13記載のヒト化モノクローナル抗体。

【請求項18】 前記ヒト定常領域がIgGである、請求項16記載のヒト化モノクローナル抗体。

【請求項19】 定常領域と可変領域を含む、志賀毒素2型および志賀毒素2型変異体に結合するヒト化モノクローナル抗体であって、前記定常領域がIgG1- $\kappa$ であり、前記可変領域が図6に記載の配列(配列番号42および配列番号44)の少なくとも一部を含む、前記ヒト化モノクローナル抗体。

【請求項20】 定常領域と可変領域を含む、志賀毒素2型および志賀毒素2型変異体に結合するヒト化モノクローナル抗体であって、前記定常領域がIgG1- $\kappa$ であり、前記可変領域が図6に記載のCDR配列の少なくとも一部を含み、前記CDR配列が以下の位置にある、前記ヒト化モノクローナル抗体：

H鎖CDR(配列番号44): CDR1-aa31-35、CDR2-aa50-66、CDR3-aa99-108

L鎖CDR(配列番号42): CDR1-aa24-40、CDR2-aa56-62、CDR3-aa95-103。

【請求項21】 請求項19記載の抗体のL鎖およびH鎖の変領域と定常領域をコードするDNAを含んでなる発現ベクターであって、前記変領域のコード配列が図6に記載のDNA配列(配列番号41および配列番号43)の少なくとも一部を含む、前記発現ベクター。

【請求項22】 請求項20記載の発現ベクターで形質転換した宿主細胞。

【請求項23】 請求項1記載の抗体、これらのフラグメントまたは誘導体、および製薬上許容される担体または希釈剤を含んでなる医薬組成物。

【請求項24】 EHECまたは他の志賀毒素産生細菌によって引き起こされる感染症に罹患した患者を治療する方法であって、治療上有効な量の請求項22記載の医薬組成物を患者へ投与することを含んでなる前記方法。

【請求項25】 EHECまたは他の志賀毒素産生細菌によって引き起こされる疾病を軽減する方法であって、予防上有効な量の請求項22記載の医薬組成物を患者へ投与することを含んでなる前記方法。

【請求項26】 請求項3記載の抗体、これらのフラグメントまたは誘導体、および製薬上許容される担体または希釈剤を含んでなる医薬組成物。

【請求項27】 EHECまたは他の志賀毒素産生細菌によって引き起こされる感染症に罹患した患者を治療する方法であって、治療上有効な量の請求項25記載の医薬組成物を患者へ投与することを含んでなる前記方法。

【請求項28】 EHECまたは他の志賀毒素産生細菌によって引き起こされる疾病を軽減する方法であって、予防上有効な量の請求項25記載の医薬組成物を患者へ投与することを含んでなる前記方法。

【請求項29】 請求項13記載の抗体、これらのフラグメントまたは誘導体、および製薬上許容される担体または希釈剤を含んでなる医薬組成物。

【請求項30】 EHECまたは他の志賀毒素産生細菌によって引き起こされる感染症に罹患した患者を治療する方法であって、治療上有効な量の請求項28記載の医薬組成物を患者へ投与することを含んでなる前記方法。

【請求項31】 EHECまたは他の志賀毒素産生細菌によって引き起こされる

疾病を軽減する方法であって、予防上有効な量の請求項 28 記載の医薬組成物を患者へ投与することを含んでなる前記方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願

本出願は、米国仮出願第60/068,635号(1997年12月23日出願)に基づいて優先権を主張する。この仮出願は引用により本明細書中に含まれるものとする。

【0002】

政府の権利

本明細書中に記載の発明は、政府の目的のために製造、実施許諾、および使用に供される場合、特許権者への使用料の支払いは不要とする。

【0003】

発明の分野

本発明は、出血性大腸炎と生命を脅かす続発症である溶血性尿毒症症候群に関連する多ユニット細菌タンパク質のファミリーに関する。「志賀毒素ファミリー(Shiga toxin family)」のメンバーと定義されるこれらのタンパク質は、マウスモノクローナル抗体の単離および同定に利用されてきたものである。本発明はさらに、マウスの可変領域を含むヒト化モノクローナル抗体の構築に関する。本発明はまた、志賀毒素または志賀トキシイドに対する抗体(モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の双方)、並びに病原性大腸菌によって引き起こされる疾患または感染症の治療、診断および予防における前記抗体の使用に関する。最後に、本発明は、志賀毒素ファミリーのタンパク質に対するヒト化モノクローナル抗体の調製に関する。

【0004】

発明の背景

腸出血性大腸菌(EHEC)は、出血性の下痢または「出血性大腸炎」(HC)および溶血性尿毒症症候群(HUS)の食物による集団発生と関連がある(Spika, Jら, J. Pediatr., 109:287-291 (1986); Remis, R., Ann, Intern. Med., 101:624-626 (1984); Riley, Lら, N. Engl. J. Med., 308:681-685 (1983))。EHEC感染は死に至る場合もあり、EHEC感染症から重度の合併症を発症する可能性が最も高い若年者や高齢者に大きな脅威を与えている。過去数年間にわたりHCおよびHUSの集団発



生や散発的発生が数件起こっており、このうち1993年の米国での集団発生が最も大きかった。この集団発生では、500件を超えるHCおよびHUSの症例が追跡調査され、Jack-in-the Boxファーストフードレストランのハンバーガーが汚染されていることを突き止めた(Centers for Disease Control and Prevention, Morbid. Mortal. Weekly Rep., 42:258(1993))。1996年の7月には、EHECの大規模な集団発生が日本で起こり、10,000人を超える感染者が発生し、8人が死亡した。日本の多くの子供たちは入院が必要であった。

## 【0005】

主に、HCおよびHUSは、汚染食品、特に、ハンバーガーなどの熱処理が不十分な牛肉製品を摂取することによって伝染する(Doyleら, J. Appl. Environ. Microbiol. 53:2394 (1987); Samadpourら, J. Appl. Environ. Microbiol. 60:1038 (1994))。EHECはウシに広まっており、また熱処理を十分に行ったハンバーガーと熱処理が不十分なハンバーガーとを見分けることが難しいので、ファーストフードレストランに立ち寄ったり家庭でのバーベキューは悲惨な事態を招く場合がある。

## 【0006】

HCおよびHUSはEHECおよびShigella dysenteriaeが産生する毒素によって媒介されるようである(概説は、O'Brien and Holmes, Microbiol. Rev., 51:206-220 (1987)を参照されたい)。これらの細菌は、1つのファミリーに属する近縁細胞毒素を産生する。本出願ではこれらをまとめて「志賀毒素(Shiga toxin)」と呼ぶことにする。志賀毒素(あるいは、「ペロ毒素」)は、細胞毒活性および腸管毒活性を有する(Strockbine, N.ら, Infect. Immun., 53:135-140 (1986))。

## 【0007】

免疫学的に交差反応性を示さない点に基づいて、志賀毒素は2つのグループに分類されている(Strockbineら、前掲)。これらのグループは、志賀毒素1型(Stx1)および志賀毒素2型(Stx2)と呼ばれている。Stx1グループには、EHEC由来の始原型Stx1毒素並びにShigella dysenteriae1型由来の志賀毒素が含まれる。近年、他のタイプの毒素が発見され、Stx2グループのメンバーとみなされている。これらは、Stx2e、Stx2cおよびStx2dである(Lindgrenら, Infection and Immunolo

gy, 61:3832 (1993); Schmitt, C.ら, Infect. Immun., 59:1065-1073 (1991);  
Marques, L.ら, FEMS Lett., 44:33-38 (1987))。

## 【0008】

本出願では、用語「志賀毒素」には、志賀毒素およびStx1もしくはStx2グループの他の任意の毒素またはこれらの変異体が含まれるものとする。略号「Stx」は毒素タンパク質自体を表すものとする。

## 【0009】

これらの毒素に曝された際の結果に関するこのような知見があるにも拘わらず、現在、HCまたはHUSに対する治療法やワクチンは知られていない。抗生物質には、細菌からの毒素放出を増加させて重度の合併症をさらに悪化させてしまうおそれがある。従って、志賀毒素によって生じるEHECの合併症を予防または治療するための化合物が求められている。このような化合物を使用して、感染患者を治療し、中枢神経系(CNS)、血液および腎臓に及ぼす毒素の全身作用を軽減することができる。さらに、毒素を中和することができれば、消化管中の細菌を死滅させるために抗生物質を安全に投与することができる。また、このような化合物を使用して、毒素に曝された個人または危険性の高い個人をEHEC感染が成立する前に処置することにより、感染による合併症を予防することもできる。このような個人としては、EHECによる下痢が検出された保育所または老人ホームに入所している子供や高齢者が挙げられる。これらの個人は重度の合併症を発症する危険性が高く、このような環境でのEHECの蔓延は珍しくない。

## 【0010】

志賀毒素の免疫学的交差反応性の知見からは、EHEC治療に対する薬理的なアプローチについて興味深い展望が得られる。現在、この疾患に対して使用できる予防薬または治療薬は知られていない。従って、当該技術分野には、志賀毒素に結合し得るモノクローナル抗体であって、これらの毒素の破壊的な作用を予防または軽減できるものを提供する必要性が存在する。また、当該技術分野では、このような抗体の結合部位に関するデータも必要であり、それにより、同様の能力を有する他の抗体を同定・単離できる。

## 【0011】

これに関連して、当該技術分野では、ヒト化モノクローナル抗体または他のヒト／マウスのキメラ・モノクローナル抗体も求められている。公知の研究では、マウス抗TNF(腫瘍壊死因子)モノクローナル抗体を投与された患者は、投与された抗体に対して抗マウス抗体応答を発現した(例えば、Exley A.R.ら, Lancet 335:1275-1277 (1990)を参照されたい)。治療レジメに対するこの種の免疫応答は、通常HAMA応答(ヒト抗マウス抗体の場合)と呼ばれ、治療の有効性を低下させ、治療を完全に無効にしてしまう場合すらある。ヒト化モノクローナル抗体またはヒト／マウスのキメラ・モノクローナル抗体は、HAMA応答を有意に低下させ、かつ治療の有効性を向上させることが分かっている(LoBuglioら, P.N.A.S. 86:4220-4224, 1989年6月)。

#### 【 0 0 1 2 】

##### 発明の概要

当該技術分野におけるこれらの要求を満たすため、本発明者らは、志賀毒素1および志賀毒素2に対するヒト化マウスモノクローナル抗体を提供する。さらに、本発明では、志賀毒素の中和に係る可変領域、並びに可変領域の特定の相補性決定領域(CDR)を記載する。本発明は特に、マウスモノクローナル抗体13C4および11E10から誘導されるヒトモノクローナル抗体であって、Stx1およびStx2とそれぞれ特異的に反応するものを提供する。

#### 【 0 0 1 3 】

別の態様では、本発明は、志賀毒素誘発性疾患を予防または治療する医薬組成物、およびこのような組成物を用いる治療方法を包含する。

#### 【 0 0 1 4 】

上述の一般的な記載と以下に述べる詳細な記載は、双方とも例示と説明を行うものであり、特許請求の範囲に記載の本発明を詳細に説明することを意図していることは理解されるべきである。

#### 【 0 0 1 5 】

添付の図面は、本発明の理解を深めるためのものであり、本明細書に含まれ、その一部を構成するものである。図面には本発明の複数の実施形態を例示し、記載と併せて本発明の原理を説明するのに役立つ。

## 【 0 0 1 6 】

本発明のさらなる特色および利点は、以下の説明において記載される。本発明の目的および他の利点は、本明細書に記載された説明および特許請求の範囲ならびに添付された図面において特に指摘された組成物および方法により実現され、達成されるであろう。これらの、および他の利点を達成するために、ならびに具体化されかつ広範に記載された本発明の目的に従って、本発明は、志賀毒素タンパク質に結合するヒト化モノクローナル抗体を記載するものである。

## 【 0 0 1 7 】

発明の詳細な説明

本発明は、志賀毒素タンパク質と結合するヒト化モノクローナル抗体、志賀毒素が引き起こす疾患の治療または予防における前記抗体の使用に関する。抗体は2本のH鎖と2本のL鎖から構成されるタンパク質様構造をしている。高等脊椎動物の抗体は、そのH鎖（それぞれ $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$ 、 $\epsilon$ ）により5つの異なるクラス、すなわちIgM、IgD、IgG、IgA、IgEに区別される。各クラスはさらにサブクラスを有し、例えば、IgGはIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4であることができ、その場合にH鎖はそれぞれ $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ または $\gamma 4$ となる。これらのクラスまたはサブクラスにおけるL鎖の対は $\kappa$ または $\lambda$ のいずれかでありうる。

## 【 0 0 1 8 】

抗体はさらに定常領域と可変領域とに二分される。H鎖とL鎖の双方において、そのカルボキシ末端側が定常配列領域を構成しており、そのアミノ末端側が可変配列領域を含んでいる。これらの可変領域内に相補性決定領域（CDR）が存在し、この領域は主として抗体に特徴的な、観察される抗原結合に関与している。

## 【 0 0 1 9 】

「ヒト化」モノクローナル抗体は、もともとは非ヒト起源であるが、ヒト成分が代わりに使用されているモノクローナル抗体を意味する。好ましい実施形態において、本発明のヒト化モノクローナル抗体は、非ヒト起源に由来する可変領域とヒト起源に由来する定常領域を含むものである。

## 【 0 0 2 0 】

上述したように、志賀毒素タンパク質（Stx）は、志賀毒素により誘発される

疾患の集団発生と関係があるEHECおよびShigella dysenteriaeにより産生される多ユニット細菌タンパク質のファミリーをさす。志賀毒素タンパク質は、Shigella dysenteriae-1型のStxおよび大腸菌(E. coli)のStx1型および2型、および2型変異体毒素を包含するものとする。

【0021】

志賀毒素が引き起こすヒト疾患としては、出血性下痢、出血性大腸炎、溶血性尿毒症症候群、および血栓性血小板減少性紫斑病が挙げられる。

【0022】

より特定した実施形態において、本発明は、少なくとも2つの明確に特徴づけられたマウスモノクローナル抗体と同様の結合特異性を有するヒト化モノクローナル抗体に関する。これら2つのモノクローナル抗体は、Strockbine, N.A.ら, Infection and Immunity, 1985, 50:695-700およびPerera, L.P.ら, J. Clinical Microbiol., 1988, 26:2127-2131に記載されるようにAlison O' Brien博士の研究所において開発されたものであり、以下に示すとおりATCCに寄託されている。

【0023】

「同様の結合特異性」とは、毒素結合と適切な対照（例えば、図9および図11参照）により示されるような非特異的バックグラウンド結合とを区別するための標準的な結合アッセイにおいて十分に検出可能な結合レベルをいう。当業者であれば、ルーチンな技能および技術を用いて結合レベルを容易に試験することができる。

【0024】

別の好ましい実施形態において、ヒト化抗体はその構造特性によって特徴づけられる。この実施形態の一面では、定常領域がヒト定常領域であり、可変領域がげっ歯類、好ましくはマウスに由来するものである。次のものに限定されるものではないが、本明細書中、特に図3および図6に示した4つの可変領域が好適である。当然、本発明は、例示した可変領域に関連する特徴的な結合を認めうるほどに低下させない修飾（すなわち、欠失、付加および置換）を含むものである。

【0025】

さらに別の実施形態において、本発明では可変領域のCDRが使用される。上記のように、CDRはL鎖とH鎖の両方の可変領域に存在し、抗原の結合に関与している。CDR領域は当業者によって容易に決定され得るため、本発明は具体的に示されたCDRに限定されない。実際、本発明者らにより作製された、以下で詳述するベクターは、志賀毒素に対する非ヒト抗体のどのようなCDRとともに使用するにも十分なものである。

#### 【0026】

本発明の最も好ましい実施形態においては、ヒト化モノクローナル抗体の定常領域がIgG1- $\kappa$ に由来し、その可変領域が図3および図6に示した配列の全部または一部に由来する。更なる実施形態において、本発明はまた、これらのヒト化モノクローナル抗体をコードする発現ベクター、および該発現ベクターで形質転換された宿主細胞に関する。

#### 【0027】

最後に、本発明は、これらのヒト化モノクローナル抗体を用いて志賀毒素産生菌による感染症を治療または予防するための医薬組成物ならびに方法を包含する。医薬組成物として、本発明は当分野で公知の希釈剤および担体、例えば患者に投与するのに適した食塩水、ショ糖溶液を含むが、これらに限定されない。本明細書中で用いる「患者」とは、イヌ、ウマ、マウスなどの感受性哺乳動物をさすが、特に好ましくはヒトのことである。

#### 【0028】

本発明はさらに、治療上有効な量の、または予防上有効な量の本発明のヒト化モノクローナル抗体を投与することを包含する。当業者には理解されるように、治療上有効な量はEHEC介在HUSに関係する浮腫、血小板減少および尿毒症を軽減する用量である。同様に、予防上有効な量は曝された個体がこれらの症状を発現するのを防止する用量である。

#### 【0029】

以下の実施例は本発明の特定の実施形態を例示するものである。

#### 【0030】

抗Stx1抗体13C4のヒト化

以下の実施例1～3は、抗Stx1抗体13C4、およびそのヒト化相当物であるH13C4に関する。

【0031】

実施例1. 13C4可変領域cDNAのクローニング

「13C4」抗体(抗Stx1)を産生するハイブリドーマ細胞は、1987年12月2日に、American Type Culture Collection, Rockville, MDに、受託番号CRL 1794として寄託され、ATCCから、または我々のようにAlison O' Brien博士から入手可能である(ハイブリドーマ作製の詳細については、Strockbine, N.A.ら, Infection and Immunity, 50:695-700 (1985)を参照のこと)。バイアル中の細胞を融解し、10% FBS(Irvine)を添加したIMDM(Mediatech)完全培地に再懸濁した。

【0032】

Midi RNA単離キット(Qiagen)を製造元の手順に従って用いて、 $1 \times 10^7$ の「13C4」細胞から全RNAを単離した。このRNAを、 $0.03 \text{ U}/\mu\text{g}$ プライマーRNA分解酵素阻害剤(5' -3')を含む10 mM Tris、0.1 mM EDTA(pH 8.4)に、最終濃度 $0.25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ まで溶解した。

【0033】

図1は、可変領域遺伝子フラグメントをクローニングする戦略を示し、図2は、使用するオリゴヌクレオチドプライマーを一覧している。製造元の手順に従い、Superscript II-MMLV逆転写酵素(Life Technologies)、ならびにマウス  $\kappa$  (oKA 57、配列番号57)およびマウス CH1(JS300、配列番号6)特異的プライマー法を用いて、「13C4」全RNA( $2 \mu\text{g}$ )をcDNAに変換した。次に、第1の鎖cDNA合成生成物を、膜型濃縮器(concentrator device)(Amicon Centricon 30またはMillipore UltraFree 15)を用いて精製した。回収したcDNAのうち、 $3 \mu\text{l}$ をPCR用の鋳型DNAとして使用した。典型的なPCR増幅反応液( $100 \mu\text{l}$ )は、鋳型DNA、50 pモルの適切なプライマー(L鎖のためには、JSS9、JSS10、JSS11、JSS12、JS153およびJSS154-配列番号9～12; H鎖のためには、JSS1、JSS2、JSS3、JSS4、JSS8およびoKA-143-配列番号1～5および配列番号15)、2.5単位のExTaqポリメラーゼ(Pan Vera)、 $1 \times \text{ExTaq}$ 反応緩衝液、 $200 \mu\text{M}$  dNTP、ならびに  $2 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ を含んだ。初回インキュベーションを $96^\circ\text{C}$ にて1分間行って、それぞれの鋳型を変性させた。40また

は50回の熱サイクル(59~72℃にて30秒、72℃にて30秒、そして96℃にて1分、ならびに最後の72℃にて5分の伸長ステップ)によりH鎖生成物を増幅した。6回の熱サイクル(46、48または54℃にて30秒、72℃にて30秒、そして96℃にて1分)、その後の35回のステップサイクル(60℃にて1分、96℃にて1分、ならびに最後の72℃にて5分の伸長ステップ)によりL鎖生成物を増幅した。Wizard PCR精製システム(Promega)を製造元の手順に従って使用して、好結果の反応液から得たPCR生成物を精製した。

#### 【 0 0 3 4 】

次いで、H鎖およびL鎖PCR生成物(約400bp)を、細菌ベクターにクローニングしてDNA配列決定した。製造元の手順に従い、1:1、3:1および5:1のインサート対ベクターモル比にて、PCRフラグメントを、pCR2.1 T/A型(style)クローニングベクター(Invitrogen)にライゲートした。各ライゲーション反応液の半分を使用して、コンピテントXL1 Blue細胞を形質転換した。

#### 【 0 0 3 5 】

診断用制限酵素消化物をEcoRI(New England Biolabs)とともに用いて、DNAインサートを含むH鎖プラスミドクローンを同定した。次に、適切な大きさ(400 bp)のインサートを含むプラスミド(tKMC217B)のDNA配列を決定した。H鎖可変領域の最終的なコンセンサスDNA配列を図3に示す。

#### 【 0 0 3 6 】

L鎖PCR生成物は、違う方法で同定した。マウス脾細胞をSP2/0ミエローマ細胞系と融合させることによって、「13C4」抗体を発現するハイブリドーマ細胞系を作製した。SP2/0細胞系は、 $\kappa$  L鎖については偽遺伝子を転写する。偽遺伝子転写体は、RT-PCRによりcDNAに変換すると、AflIII制限部位を含む。L鎖候補クローン(tKMC226および227)を、製造元の手順を用いてAflIII(New England Biolabs)で消化して、適切な大きさのインサート(403bp; これらの生成物にはAflIII部位は存在しない)を含むクローンを同定した。L鎖可変領域の最終的なコンセンサスDNA配列は図3に示す。図中、CDRは下線を引いて示す。

#### 【 0 0 3 7 】

実施例 2 . 発現ベクター tKMC249A の構築



次に、H鎖およびL鎖可変領域を、哺乳動物発現プラスミドベクターにサブクローニングして、組換えキメラマウス/ヒト抗体分子を産生した。このベクターは、CMV転写プロモーターの制御下で組換え抗体分子を産生する。H鎖分子は、可変領域配列をヒトIgG1定常ドメインに直接融合する直接cDNA構築物である。一方、L鎖分子は、可変領域をコードするフラグメントの3'側にマウスκイントロン領域を有する。スプライシングの後、可変領域は、ヒトκ定常領域エキソンに融合される(図4)。哺乳動物細胞中のベクターのための選択マーカーは、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ(neo)であり、薬剤G418(CellTech)を用いる。

#### 【 0 0 3 8 】

##### A. 発現ベクターの作製

H鎖およびL鎖発現ベクターを作製するためには、DNAフラグメントライゲーションステップおよび部位特異的突然変異誘発ステップを必要とした。CMVプロモーターに制御される転写により、両方の抗体鎖を発現するベクターが得られた。ネオマイシン耐性は、哺乳動物細胞のトランスフェクションについての優位な選択マーカーとして作用する。また、これらのベクターは、EcoRV/BstBIフラグメントとして任意のL鎖可変領域を、NruI/EcoRIフラグメントとして任意のH鎖可変領域を、およびEcoRI/NotIフラグメントとして任意のH鎖定常ドメインを簡便にクローニングできるように設計された。これらの制限部位は、ヒトおよびマウス可変領域において(たとえあったとしても)めったに存在しないために選択された。マウスJ領域/κイントロンフラグメントはヒトκエキソンに融合されて、転写後のスプライシングによりマウスヒトキメラκL鎖が生成される。最後に、ベクターから全抗体発現カセットを切出す(BglII/NheI)ことが容易になるようにベクターは設計された。該発現カセットは、BamHI/NheIで切断された別のベクターにライゲートされ、両方の鎖のための機構(apparatus)を有する発現ベクターが作製された。

#### 【 0 0 3 9 】

ベクターのバックボーンとして、プラスミドpCDNA3(Invitrogen)を用いた。このプラスミドを、HindIII/XhoIで切断し、「L鎖ポリリンカー」DNAフラグメント

を挿入して、開始「L鎖ベクター」pCDNA3.LCPLを作製した(図12を参照)。このリンカーは、後続するクローニングステップを容易にするために、制限部位HindIII、KpnI、ClaI、PmlI、EcoRV、XmaI、BamHIおよびXhoIを含んだ。L鎖リーダー、マウス抗CKMBκ L鎖ゲノムフラグメントおよび3' UTRを含むSmaI/BclI DNAフラグメントを、pCDNA3.LCPLのEcoRV/BamHI部位にクローニングした。このフラグメントに含まれるマウスκイントロン、エキソンおよび3' UTRは、Richard Near博士(Near, R.I.ら, 1990, Mol. Immunol. 27:901-909)から入手したLCPXK2に由来した。その後、突然変異誘発を行い、NruI(209)、MluI(229)およびBstBI(2962)を除去し、NheI(1229)およびBamHI(1214)部位を導入して、プラスミドpCDNA3mut.LCPL.LCVKを作製した(図12を参照)。

## 【0040】

第2の「H鎖ベクター」であるpCDNA3mut.HCPLは、pCDNA3mut.LCPL.LCVKプラスミドから、L鎖発現領域(HindIII/XhoI)を制限部位HpaI、BspEI、EcoRV、KpnIおよびXhoIからなる「H鎖ポリリンカー」と置き換えることによって構築した。このプラスミドを、EcoRVおよびKpnIで消化した。次に、H鎖リーダーおよび抗CKMB IgG2bマウスH鎖ゲノムフラグメントを含むSmaI/KpnIで消化したDNAフラグメントを、EcoRV/KpnIで消化したプラスミドにライゲートした。その後、3' UTR、およびSall部位の上流にあるNotIを含むKpnI/Sallオリゴヌクレオチドフラグメントを、KpnI/XhoIで消化したプラスミドにクローニングし、(XhoI部位をノックアウトし)、プラスミドpCDNA3mut.HCPL.HCV2bを作製した(図13を参照)。

## 【0041】

次いで、ヒトκ L鎖定常ドメインを、EcoNI/XhoIフラグメントとしてpCDNA3mut.LCPL.LCVKにクローニングし、プラスミドtKMC180C2を生成した。ヒトIgG1定常ドメインを、EcoRI/NotIフラグメントとしてpSUN10にクローニングし、プラスミドpJRS313を作製した。13C4の可変領域を、(上述したように)これらの2つのベクターにクローニングした。次いで、ヒトH鎖ベクターtKMC229C由来のBglII/NheIフラグメントを、BamHI/NheIで切断したヒトL鎖ベクターtKMC231Dにクローニングして、tKMC249を作製した(図4を参照)。

## 【0042】

### B. 可変領域の発現ベクターへのサブクローニング

発現ベクターにクローニングするフラグメントに適合したプライマーを用いたPCRにより、可変領域遺伝子フラグメントを再度増幅した(図2および4を参照)。H鎖順方向プライマー(oKA143、配列番号15)は、H鎖リーダーのC末端をコードする5'端、およびクローニングのためのNruI制限部位を含む。一方、H鎖逆方向プライマー(oKA144、配列番号14)はクローニングのための3' EcoRI制限部位を加える。L鎖順方向プライマー(oKA145、配列番号16)は、クローニングのために、L鎖可変領域のN末端においてEcoRV制限部位を導入する。一方、L鎖逆方向プライマー(oKA146、配列番号17)は、連結する領域- $\kappa$ エキソンスプライス部位のための3' DNA配列、続いてクローニングのためのBstBI制限部位を加える。

#### 【0043】

PCR反応は、上述した試薬、およびPvuI(New England Biolabs)で消化されたプラスミド1~2 ngを鋳型として用いて行った。これらの鋳型はそれぞれ、96℃にて1分の初回インキュベーションにより変性した。H鎖生成物を、35回の熱サイクル(55または60℃にて30秒、72℃にて30秒、そして96℃にて1分、ならびに最後の72℃にて5分の伸長ステップ)により増幅した。L鎖生成物を、8回の熱サイクル(55または60℃にて30秒、72℃にて30秒、そして96℃にて1分)、ならびにその後30回のサイクル(60℃にて1分、96℃にて1分、ならびに最後の72℃にて5分の伸長ステップ)により増幅した。

#### 【0044】

Qiaquick PCR精製カラム(Qiagen)を製造元の手順に従って使用して、13C4H鎖PCR生成物(約400bp)を精製し、続いてNruIおよびEcoRI(New England Biolabs)で消化した。消化したPCR生成物は、Wizard PCR精製システム(Promega)を製造元の手順に従って使用して精製し、NruI/EcoRIで消化し、かつゲル精製したpJRS313にライゲートして、プラスミドtKMC229Cを得た(図4を参照)。この構築物において、H鎖可変領域の最終的なコンセンサスDNA配列、および制限部位の適切なプライミングを確認した。

#### 【0045】

Qiaquick PCR精製カラム(Qiagen)を製造元の指示に従って用いて13C4L鎖PCR

生成物(約350bp)を精製し、その後EcoRVおよびBstBI(New England Biolabs)で消化した。消化したPCR生成物は、Qiaquick PCR精製カラム(Qiagen)を製造元の手順に従って使用して精製し、(上述したように)EcoRV/BstBIで消化かつゲル精製されたtKMC180C2にライゲートし、プラスミドtKMC231Dを得た(図4を参照)。この構築物において、L鎖可変領域の最終的なコンセンサスDNA配列、および制限部位の適切なスプライシングを確認した。

#### 【 0 0 4 6 】

### 実施例3. 組換えキメラマウス/ヒト13C4抗体の安定した作製

#### A. NS0細胞のトランスフェクション

プラスミドtKMC249Aを、PvuI(New England Biolabs)で直線化した後に、エレクトロポレーションを用いて、NS0細胞(Baxter International, Inc., Durand, CA)にトランスフェクトした。40 $\mu$ gの消化されたプラスミドを、0.4cmのキューベット中の $1 \times 10^7$ 細胞と総容量800 $\mu$ lとして混合し、250mA、960 $\mu$ Fのパルスにかけた。24時間後、細胞を、96ウェル組織培養プレートにプレートアウトし(200 $\mu$ l/ウェルで6プレート)、37℃にて、10% CO<sub>2</sub>下でインキュベートした。コロニーが現れたら、「ヒト化」抗体の産生、および発現抗体がStx1と結合する能力について上清をアッセイした。

#### 【 0 0 4 7 】

#### B. 抗体産生についてのアッセイ

安定したトランスフェクト体についての抗体産生および活性アッセイを、以下に記載するように行った。これらのアッセイは、上記プラスミド構築物を用いた細胞のトランスフェクションにより、ヒト化キメラバージョンの13C4マウスハイブリドーマ抗体(H13C4と名称)を産生する安定な細胞系が生成されることを示す。

#### 【 0 0 4 8 】

Tris-HCl被覆バッファー(pH8.5)を用いたヤギ抗ヒトIgG抗体(Pierce or Biodesign International)の1:500希釈液で被覆された96ウェルマイクロタイタープレート(Maxisorp F8; Nunc, Inc.)から得た8ウェルストリップ(strips)において、抗体産生ELISAアッセイを行った。プレートを覆い、4℃にて一晩インキュベートした。次いで、プレートを、洗浄貯蔵バッファー(wash storage buffer)(Tr

is-HCl/NaCl/0.1% NaN<sub>3</sub>)で一度洗浄した。次に、50 $\mu$ lの培養上清を、50 $\mu$ lのサンプル/コンジュゲート希釈液(Tris-HCl/NaCl/ゼラチン/Tween-20)をあらかじめ充填した各ウェルにアプライした。プレートを、回転装置上で、30~60分間室温にてインキュベートした。次いで、これらを洗浄溶液(イミダゾール/NaCl/Tween-20)で3回洗浄した。ヤギ抗ヒト $\kappa$ -HRP(Southern Biotechnologies)コンジュゲートを、サンプル/コンジュゲート希釈液で1:250に希釈し、100 $\mu$ lをウェルに加えた。プレートを、回転装置上で、30~60分間室温にてインキュベートした。洗浄バッファーを用いて6回洗浄し、100 $\mu$ L/ウェルのABTS発色基質(Kirkgaard and Perry Laboratories)で8分間室温にてインキュベートした。100 $\mu$ L/ウェルの希釈消光(Quench)バッファー(Kirkgaard and Perry Laboratories)で反応を停止した。自動マイクロタイタープレートELISAリーダー(Ceres UV900HI, Biotek, Winooski, Vermont)を使用して、405nmでの吸光度を測定した。ELISAアッセイにおける対照は、ヒトIgG1 $\kappa$ 骨髄腫タンパク質(Biodesign International)、およびトランスフェクトされていないNS0細胞から回収した上清を用いた。上記アッセイ(図8を参照)は、上記プラスミド構築物を用いた細胞のトランスフェクションにより、細胞が、ヒトH鎖(IgG)およびL鎖( $\kappa$ )ドメインの両方を含む分子を生成することを示す。

#### [ 0 0 4 9 ]

次に、発現された抗体がStx1タンパク質に結合する能力について、上清をELISAによりアッセイした。活性アッセイは、Alison O' Brienから入手した(または実施例7に記載のようにして得た)約0.1 $\mu$ g/ウェルの精製Stx1で被覆された96ウェルマイクロタイタープレート(Maxisorp F8; Nunc, Inc.)から得た8ウェルストリップにおいて行った。プレートの被覆、およびELISA法は、発色基質のABTSをTMB(Kirkgaard and Perry Laboratories)に置換えた以外は、上記抗体アッセイと同じように行った。450nmにおける吸光度を、自動マイクロタイタープレートELISAリーダー(Ceres UV900HI, Biotek, Winooski, Vermont)を使用して測定した。陽性対照として元のマウスモノクローナル抗体13C4を使用し、1:2000で希釈したヤギ抗マウスIgGコンジュゲート(Jackson Laboratories)を用いてアッセイした。このアッセイ(図9を参照)は、上記プラスミド構築物を用いて細胞をト

ランスフェクションすると、細胞が、StxIに結合する免疫グロブリンを産生することを示す。抗Stx可変領域を欠くマウスIgG1KおよびヒトIgG1Kの両方とも、毒素を結合しなかった。

#### 【 0 0 5 0 】

##### EHEC抗Stx2抗体：11E10のヒト化

以下の実施例4～7は、抗Stx2および-Stx2変異抗体11E10、ならびにそのヒト化カウンター構造H11E10に関する。

#### 【 0 0 5 1 】

##### 実施例4. 11E10可変領域cDNAのクローニング

「11E10」抗体(抗Stx2)を産生するハイブリドーマ細胞系は、1990年8月1日に、アメリカンタイプカルチャーコレクション(Rockville, MD)に、受託番号CRL 1987として寄託され、ATCCから、または本発明者らのようにAlison O' Brien博士から入手可能である(ハイブリドーマ作製の詳細については、Perera, L.P.ら, J. Clinical Microbiol., 26:2127-2131 (1988)を参照のこと)。バイアル中の細胞系を融解し、血清を含まない培地で洗浄し、10% FBS(Irvine)を添加したIMDM(Mediatech)完全培地に再懸濁した。

#### 【 0 0 5 2 】

RNeasy RNA単離キット(Qiagen)を製造元の手順に従い用いて、 $1 \times 10^7$ の「11E10」細胞から全RNAを単離した。このRNAを、 $0.03 \text{ U}/\mu\text{g}$ プライマーRNA分解酵素インヒビター(5' -3')を含む10 mM Tris、0.1 mM EDTA(pH 8.4)に、最終濃度 $0.63 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ まで溶解した。

#### 【 0 0 5 3 】

図1は、可変領域遺伝子断片をクローニングする概略を示し、図5は、使用するオリゴヌクレオチドプライマーを挙げている。Superscript II-MMLV逆転写酵素(Life Technologies)を製造元の手順に従い用いて、「11E10」全RNA( $2.5 \mu\text{g}$ )をcDNAに変換した。マウスL鎖(JS153、JS154、配列番号11および12)ならびにマウスH鎖(JS300、配列番号6)を特異的プライマーとして使用した。次に、第1鎖cDNA合成生成物を、Centricon-30濃縮器(Amicon)を用いて精製した。回収した $70 \mu\text{l}$ のcDNAのうち、 $3.5 \mu\text{l}$ をPCR用の鋳型DNAとして使用した。典型的なPCR増幅反応

液(100 $\mu$ l)は、鋳型DNA、50 pモルの適切なプライマー(L鎖のためには、JS153、JS154およびJS009、JS010、JS011、JS012、配列番号7~12; H鎖のためには、JS160、JS161、JS162およびJS001、JS002 JS003 JS004 JS008、配列番号28~30、配列番号2~5)、2.5単位のExTaqポリメラーゼ(Pan Vera)、1 $\times$ ExTaq反応バッファ、200 $\mu$ M dNTP、ならびに2 mM MgCl<sub>2</sub>を含む。初めにインキュベーションを96 $^{\circ}$ Cにて5分間行って、鋳型を変性させた。生成物を、35回の熱サイクル(96 $^{\circ}$ Cにて1分、55 $^{\circ}$ Cにて30秒、72 $^{\circ}$ Cにて30秒)、その後72 $^{\circ}$ Cにて5分処理することにより増幅した。WizardPCR精製システム(Promega)を製造元の手順に従って使用して、好結果の反応液から得たPCR産物を精製した。

#### 【0054】

次いで、H鎖PCR産物(約400bp)およびL鎖PCR産物(約350bp)を、細菌ベクターにクローニングして、DNA配列決定した。製造元の手順に従い、3:1のインサート対ベクターモル比にて、PCR断片を、pCR2.1 T/A型クローニングベクター(Invitrogen)にライゲートした。2 $\mu$ lのライゲーション反応液を使用して、製造元の手順に従いINV $\alpha$ F' コンピテント細胞(Invitrogen)を形質転換した。EcoRI(New England Biolabs)を用いた診断制限酵素消化物を用いて、DNAインサートを含むプラスミドクローンを同定した。その後、適切な大きさ(400 bp)のH鎖インサートを含むプラスミドのDNA配列を決定した。11E10のH鎖可変領域の最終的なコンセンサスDNA配列は図6に示す。CDRは下線を引いて示す。

#### 【0055】

「11E10」抗体を発現するハイブリドーマ細胞系はマウス脾細胞をSP20骨髓腫細胞と融合して作製されるため、L鎖プラスミドクローンはさらに特徴づけする必要がある。SP20細胞系は、 $\kappa$  L鎖の偽遺伝子を転写する。偽遺伝子転写産物は、R-T-PCRによりcDNAに変換すると、AflIII制限部位を含む。これにより、L鎖可変領域のためのプラスミドクローンをAflIIIで消化し、切断されなかった産物をその後DNA配列決定に供した。L鎖可変領域の最終的なコンセンサスDNA配列は図6に示し、CDRは下線を引いて示す。

#### 【0056】

発現ベクターにクローニングする断片に適合したプライマーを用いるPCRによ

り、可変領域遺伝子断片を再度増幅した(図5および7を参照)。H鎖順方向プライマー(11E10HF、配列番号37)は、H鎖リーダーのC末端をコードする5'端、およびクローニングのためのNruI制限部位を含む。一方、H鎖逆方向プライマー(11E10HB、配列番号38)はクローニングのための3' EcoRI制限部位を加える。L鎖順方向プライマー(11E10LF、配列番号39)は、L鎖リーダーのC末端をコードする5'端、およびクローニングのために、L鎖可変領域のN末端においてEcoRV制限部位を含む。一方、L鎖逆方向プライマー(11E10LB、配列番号40)は、連結する領域-κエキソンスプライス結合部位のための3' DNA配列、そして続いてクローニングのためのBstBI制限部位を加える。96℃にて5分間のインキュベーションの後、PCRパラメータが30回の熱サイクル(96℃にて1分、62℃にて30秒、および70℃にて30秒)ならびに72℃にて5分の処理であったこと以外は、PCRを上記したように行った。

#### [ 0 0 5 7 ]

その後、H鎖可変領域PCR産物を、哺乳動物発現プラスミドベクター (pJRS315、以下の実施例5に記載するように作製)にサブクローニングして、組換えキメラマウス/ヒト抗体分子を作製した。得られたベクタークローンはpACE1と称した。L鎖可変領域は、哺乳動物発現ベクターにサブクローニングする前に、上述したようにpCR2.1T/A型クローニングベクターにサブクローニングした。得られたプラスミドはpACELCと称し、BstBI/EcoRVで消化して、L鎖可変領域を切り出した。その後、可変領域を、[11E10]H鎖可変領域(pACE1)を含む哺乳動物発現ベクターにサブクローニングした。最終的な発現ベクタークローンをpACE4と称した。このベクターは、CMV転写プロモーターの制御下で組換え抗体分子を産生する。H鎖分子は、可変領域配列をヒトIgG1定常ドメインに直接融合する直接cDNA構築物である。一方、L鎖分子は、可変領域をコードするフラグメントの3'側にマウスκイントロン領域を有する。スプライシングの後、可変領域は、ヒトκ定常領域エキソンに融合される(図7を参照)。哺乳動物細胞におけるベクターのための選択マーカーは、ネオマイシン(G418)である。

#### [ 0 0 5 8 ]

pACE1の生成のために、[11E10]H鎖PCR産物(約400bp)をNruIおよびEcoRI(New E



ngland Biolabs)で消化し、Qiaquick PCR精製カラム(Qiagen)を製造元が指示するように使用して精製し、そしてNruI/EcoRIで消化かつゲル精製されたpJRS315にライゲートし、プラスミドpACE1を得た(図7を参照)。

#### 【 0 0 5 9 】

「11E10」L鎖PCR産物(約350bp)を、製造元の指示に従ってT/Aクローニングベクターにクローニングした。得られたクローンであるpACELCを、EcoRVおよびBstBI(New England Biolabs)で消化し、L鎖フラグメントをゲル精製した。次に、このフラグメントを、EcoRV/BstBIで消化かつゲル精製されたpACE1にライゲートして、プラスミドpACE4を得た(図7を参照)。H鎖およびL鎖可変領域の配列を、哺乳動物細胞トランスフェクションの前に確認した。

#### 【 0 0 6 0 】

#### 実施例5. 発現ベクターpJR315の構築

プラスミドpJR315は、その中に11E10抗体の可変部がクローニングされた発現プラスミドである。このプラスミドは、抗体可変領域コード情報を含有しない基本発現ベクターであるプラスミドpSUN15の誘導体であり、pJRS315は、DNA断片ライゲーションおよび部位特異的変異誘発工程を使って作製される。その結果、CMVプロモーターが駆動する転写により両方の抗体鎖を発現するベクターが得られる(図17参照)。ネオマイシン耐性は、哺乳類動物細胞のトランスフェクションに対する優性選択マーカーとしての役目を果たす。さらに、EcoRV/BstBIフラグメントとして任意のL鎖可変領域、NruI/EcoRIフラグメントとしてH鎖可変領域、およびEcoRI/NotIフラグメントとしてH鎖定常ドメインの好都合なクローニングを可能にするように設計されている。これらの制限酵素切断部位を選んだのは、これらがヒトおよびマウスの可変領域に(たとえあるにしても)稀にしか生じないからである。転写後スプライシングの後にマウス/ヒト-キメラκL鎖が作られるように、ヒトκエキソンに融合したマウスJ領域/κイントロン断片がある。

#### 【 0 0 6 1 】

ベクターの主鎖はプラスミドpCDNA3(Invitrogen)であった。このプラスミドをHindIII/XhoIで切断し、「L鎖ポリリンカー」DNA断片を挿入して出発「L鎖ベクター」を作製した。このリンカーは、その後のクローニング工程を容易にするた

めの制限部位HindIII、KpnI、ClaI、PmlI、EcoRV、XmaI、BamHIおよびXhoIを含有して、プラスミドpCDNA3.LCPLを作製した。L鎖リーダー、抗CKMB $\kappa$ L鎖ゲノム断片、および3'UTRを含有するSmaI/BclI-DNA断片を、pCDNA3.LCPLのEcoRV/BamHI部位中にクローニングした。この断片中のマウス $\kappa$ イントロン、エキソンおよび3'UTRは、リチャード・ニア博士(Dr.Richard Near) (Near, R.I.ら, Mol. Immunol. 27:901-909, (1990))から受領したLCPXK2から誘導した。その後、変異誘発を実施してNruI(209)、MluI(229)、およびBstBI(2962)を排除し、NheI(1229)およびBamHI(1214)部位を導入してpcDNA3mut.LCPL.LCVKを作製した(図12参照)。

#### 【 0 0 6 2 】

第2の「H鎖ベクター」は、pcDNA3mut.LCPL.LCVKプラスミドから、L鎖発現領域(HindIII/XhoI)を制限部位HpaI、BspEI、EcoRV、KpnI、およびXhoIからなる「H鎖ポリリンカー」により置換することによって構築した。このプラスミドをEcoRVおよびKpnIで消化した。その後、H鎖リーダーおよび抗CKMB IgG2bマウスH鎖ゲノム断片を含有するSmaI/KpnI消化DNA断片を、EcoRV/KpnI消化プラスミド中にライゲートした。続いて、Sall部位の上流に3'UTRおよびNotIを含有するKpnI/Sallオリゴヌクレオチド断片を、KpnI/XhoI消化プラスミド中に(XhoI部位をノックアウトして)クローニングしてプラスミドpCDNA3mut.HCPL.HCV2bを作製した(図13参照)。

#### 【 0 0 6 3 】

この時点から、抗CKMB可変または定常ドメインDNA配列を全く有さない2つのベクターを作製した。これは、プラスミドpcDNA3mut.LCPL.LCVKをEcoRV/XhoIにより切断し、EcoRV、BstBI、およびXhoI部位を含有するリンカーオリゴヌクレオチド断片を挿入することによって行い、pSUN9を作製した(図14参照)。同様な方法で、pCDNA3mut.HCPL.HCV2b中の抗CKMBフラグメント(NruI/NotI)をNruI、EcoRIおよびNotI部位を含有するリンカーオリゴヌクレオチド断片によって置換して、pSUN10を作製した(図15参照)。その後、ヒト $\kappa$ L鎖定常ドメインをpSUN9中にBstBI/XhoI断片としてクローニングし、ヒトIgG1定常ドメインをpSUN10中にEcoRI/NotI断片としてクローニングした。

#### 【 0 0 6 4 】

その後、ヒトH鎖ベクターからのBglII/NheI断片を、BamHI/NheIで切断したヒトL鎖ベクター中にクローニングしてpSUN15を作製した(図16参照)。

【 0 0 6 5 】

その後、プラスミドpJRS315をpSUN15を使って、次のプロセスを通して構築した。他の、無関係な、ハイブリドーマ細胞系からのH鎖可変領域(ほぼ400bp)をNruIおよびEcoRI(New England Biolabs)で消化し、Qiaquick PCR精製カラム(Qiagen)を使って製造者の記載のとおり精製し、そして、NruI/EcoRIで消化しゲル精製したpSUN15中にライゲートして、プラスミドpJRS311を得た(図16参照)。

【 0 0 6 6 】

この時点で、ヒト $\kappa$ エキソン断片に融合したマウス $\kappa$ J- $\kappa$ イントロン断片を含む有するBstBI/NotI(New England Biolabs) DNA断片を、消化し、ベクターtKMC180C2からゲル精製した。この断片を、BstBI/NotIで消化したpJRS311の主鎖中に連結反応し、ゲル精製してプラスミドpJRS315を得た(図17参照)。

【 0 0 6 7 】

実施例 6. 組換えキメラマウス/ヒト「11E10」抗体の安定な産生

A. NS0細胞のトランスフェクション

プラスミドpACE4を、NS0細胞中にエレクトロポレーションを使ってトランスフェクトした。該プラスミドをPvuI制限酵素消化により線状化した。全容積400 $\mu$ L中で、消化したプラスミドDNAの40 $\mu$ gを $7 \times 10^6$ 細胞と混合し、室温で1分間、静かに攪拌してインキュベートした。10 $\mu$ LのDMSO(Sigma)を添加して最終濃度1.25%とした。細胞/DNA/DMSO混合物を、冷0.4cmキューベットに移し、250ボルト、960 $\mu$ Fの1パルスをかけた。該細胞を、5mlのDMSO(最終濃度1.25%)を補給した非選択培地を含有する6ウェルプレートの1つのウェルに移した。37℃および10%CO<sub>2</sub>下で24時間後、該細胞を、96ウェルマイクロタイタープレート中にまいた。コロニーが現れると、上清を「ヒト化」抗体の産生についておよび発現した抗体のStx2毒素との結合能力についてアッセイした。

【 0 0 6 8 】

B. 抗体産生のアッセイ

安定なトランスフェクタントについての抗体産生および活性アッセイは、ヤギ抗ヒトF(ab'), 抗IgG抗体 (Southern Biotechnology) の1:500希釈物でコートした96ウェルマイクロタイタープレート (Maxisorp F8: Nunc, Inc.) からの8ウェルストリップ中で、重炭酸塩コーティングバッファー、pH 8.5を使って実施した。該プレートは、感圧フィルム (Falcon, Becton Dickinson) で覆い、一夜、4℃でインキュベートした。その後、プレートを1回、洗浄溶液 (イミダゾール/NaCl/0.4% Tween-20) で洗浄した。その後、培養上清の100 $\mu$ Lを添加し、プレート回転器上で、30分間、室温でインキュベートさせた。該プレートを5回、洗浄溶液 (イミダゾール/NaCl/0.4% Tween-20) で洗浄した。ヤギ抗ヒト $\kappa$ HRP (Southern Biotechnology) コンジュゲートを、サンプル/コンジュゲート希釈物中に1:800で希釈し、100 $\mu$ Lをサンプルに加え、その後、プレート回転器上で30分間、室温でインキュベートした。サンプルを上記のように洗浄し、その後、ABTS現像基質 (Kirkgaard & Perry Laboratories) をウェル当たり100 $\mu$ L用いてインキュベートし、405nmでの吸光度値を自動マイクロタイタープレートELISAリーダー (Ceres UV900H1, Bio Tek Instruments, Winooski, Vermont) を使って測定した。このアッセイ (図10参照) は、細胞のこのプラスミド構築物によるトランスフェクションによって、ヒトIgGおよび $\kappa$ ドメインの両方を含有する分子を産生する細胞をもたらすことを実証する。

## 【 0 0 6 9 】

その後、上清を、発現した抗体のEHEC Stx2毒素と結合する能力についてアッセイした。活性アッセイは、上記のように、重炭酸塩コーティングバッファー、pH 8.5中のStx2毒素 (実施例7のように、Dr. O'Brien's labから得た) を用いて1 $\mu$ g/mlでコートしたプレートを使って実施した。このアッセイは、このプラスミド構築物による細胞のトランスフェクションによって、効果的に志賀毒素2型に結合する11E10マウスモノクローナル抗体のヒト化キメラ形態の産生が可能であることを実証する (図11)。

## 【 0 0 7 0 】

これらのアッセイは同時に、このプラスミド構築物による細胞のトランスフェクションによって、11E10マウスハイブリドーマ抗体のヒト化キメラ形態を産生

する安定細胞を作ることが可能であることを実証する。

【 0 0 7 1 】

実施例 7. ヒト化抗体の志賀毒素に対する生物学および免疫学的有効性の実証

A. ペロ細胞の細胞傷害性アッセイ

実施例 1 ～ 6 に記載したように得られたヒト化抗体の志賀毒素に対する有効性を、ペロ細胞を毒素から保護する能力をアッセイして確認した。細胞傷害性アッセイは、本質的に Gentry および Dalrymple, J. Clin. Microbiol., 12:361-366 (1980) が記載したように実施した。簡単に説明すると、毒素は、プラスミド pLPSH 3 (Stx をコードする ; J. Infect. Disease 164:344-352 (1991)) または pMJ100 (Stx2 をコードする ; Inf. and Immunity, 57:3743-3750 (1989)) のどちらかを含有する大腸菌 (E. coli) K-12 株の培養から得た。細菌は、超音波溶解により破壊し、遠心分離により清澄化した。抽出物は、組織培養培地 (10% ウシ胎児血清、0.8mM グルタミン、ペニシリン G の 500U/ml、およびストレプトマイシンの 500mg/ml を含有するダルベッコ変法イーグル培地) 中に段階的に希釈した。溶解物の 10 倍希釈物の 100  $\mu$  l を、培地 100  $\mu$  l 中に約  $10^4$  個のペロ細胞を含有するマイクロタイタープレートウェルに添加した。該組織培養細胞を、37℃、5%CO<sub>2</sub> 中で 48 時間インキュベートし、その後、固定し、クリスタルバイオレットで染色した。固定し染色した細胞の色の強度を、Titertek リーダーを用いて 620nm で測定した。抗体なしのインキュベーションは、Stx に対する標準毒性曲線を与える。

【 0 0 7 2 】

B. 抗血清中和アッセイ

実施例 1 ～ 6 に記載した方法によって得たヒト化マウス抗体を、毒素中和について試験した。細胞傷害性活性の中和は、Schmitt ら, Infect. and Immun., 59:1065-1073 (1991) に非常に詳しく記載されている。簡単に説明すると、溶解物を、ヒト化マウス抗体の段階希釈物とともに 37℃ で 2 時間インキュベートした。その後、上に記載のとおり、サンプルの 100  $\mu$  l をペロ細胞に添加した。

【 0 0 7 3 】

【 表 1 】

表1：ペロ細胞中和アッセイ

抗体	1 $CD_{50}$ *を中和するのに必要なng
マウス13C4	25
ヒト化13C4	26
マウス11E10	2.7
ヒト化11E10	82.8

\* (1  $CD_{50}$ =1 pg純毒素)

【 0 0 7 4 】

#### 実施例 8. ヒト化抗体による受動免疫

##### A. 粗Stx1毒素による注入に対する保護

第0日に、5匹のCD-1マウスの群に、抗体H13C4（ヒト化 $\alpha$ -Stx1B）、13C4（マウス $\alpha$ -Stx1B）、H11E10（ヒト化 $\alpha$ -Stx2A）、またはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）を腹腔内注入（0.1ml）した。第1日に、これらの注入を繰り返した。その後、粗Stx1毒素（実施例7に記載されたように得た）を用いて用量 $1.7 \times 10^5$ または $1.7 \times 10^6$   $CD_{50}$ で静脈注入してマウスをチャレンジした。毒素のこの用量は、毒素の様々な量を用いた予備実験によって選定した。マウスを21日間モニターした。

【 0 0 7 5 】

結果（表2）は、明らかに、注入した抗体は、通常の致死毒素用量の少なくとも10倍に対して、マウスを保護することを示す。陰性対照として、Stx2に対する抗体はStx1毒素チャレンジに対して保護せず、該保護は毒素／抗体のペアに特異的であったことを示し、抗体調製プロセスの人工産物でなかったことを示した。

【 0 0 7 6 】

【表2】

表2：粗Stx1を静脈注入したCD-1マウス

抗体 (用量/マウス)	保護された#LD <sub>50</sub>	1 LD <sub>50</sub> *から保護するための抗体 $\mu$ g/kg
マウス13C4 (1.4 $\mu$ g)	10	6.1
ヒト化13C4 (4.1 $\mu$ g)	20	8.9
ヒト化11E10 (232 $\mu$ g)	0	保護なし

\* (1 LD<sub>50</sub>=30 ng 粗Stx1)

## 【 0 0 7 7 】

## B. Stx-2産生EHEC株による経口感染に対する保護

マウスおよび細菌の2つの異なる株をこの研究に使用して、Stx2およびStx2変異体の両方に対する有効性を試験した。DBA/2JマウスをEHEC株86-24(0157:H7, Stx2')により、また、CD-1マウスを株B2F1(091:H21, Stx2変異体')によりチャレンジした。大腸菌(E.coli)株B2F1は通常、両方のマウスに対して致命的であり、大腸菌(E.coli)株86-24はDBA/2Jマウスに対して致命的であるが、CD-1マウスは86-24感染で生存するであろう。

## 【 0 0 7 8 】

第0日に、抗体H11E10(ヒト化 $\alpha$ -Stx2A)または11E10(マウス $\alpha$ -Stx2A)を、4匹または5匹のマウスの群に腹腔内注入(0.1ml)した。対照群は、抗体13C4(マウス $\alpha$ -Stx1B)を受けたマウス、11E10腹水(マウス $\alpha$ -Stx2A)を受けたマウス、または抗体の代わりにPBSを受けたマウスを含んでいた。マウスには、飲用水中にストレプトマイシン(5g/L)を与えて通常の腸内細菌叢を減少させ、かつ食餌を除去した。株86-24(0157:H7, Stx2')およびB2F1(091:H21, Stx2変異体')のストレプトマイシン耐性誘導株を一夜、L培養液中で増殖させた。

## 【 0 0 7 9 】

翌日(第1日)、マウスは試験抗体、対照抗体、またはPBSの第2回目の注入を受けた。マウスに、ベレット化して20%スクロース中に再懸濁した86-24の10<sup>10</sup> CFU、または20%スクロース中に段階的に希釈したB2F1の10<sup>3</sup> CFUを、直ぐ与えた。食餌をケージに戻し、マウスを21日間モニターした(CFU=コロニー形成単位)。

## 【 0 0 8 0 】

表3に示すように、マウスまたはヒト化抗Stx2抗体のどちらかを用いたマウスの免疫感作は、EHECの致死経口用量からの完全な保護をもたらした。Stx2毒素の代わりにStx1毒素に免疫反応性のあることを除いて同じ方法で調製したマウス13C4抗体による免疫感作は、86-24によるチャレンジから保護せず、結果は該応答の免疫特異性を示す。

【 0 0 8 1 】

【表3】

表3： 10<sup>10</sup>CFU 0157(Stx2)を与えたDBA/2Jマウス

抗体 (用量/マウス)	生存数
マウス13C4 (1.4 $\mu$ g)	0/5
マウス11E10 (1.0 $\mu$ g)	5/5
ヒト化11E10 (1.0 $\mu$ g)	5/5

【 0 0 8 2 】

より耐性のあるCD-1マウスにStx2変異体毒素を産生するB2F1大腸菌 (E. coli) 株を与えた場合の、同様な結果を表4に示した。抗体による処理がなければ、全て致死であるが、マウスおよびヒト化抗体の双方はStx2変異体に対し用量に依存して保護した。

【 0 0 8 3 】

【表4】

表4： 10<sup>3</sup>CFU 091:H21(Stx2変異体)を与えたCD-1マウス

抗体 (用量/マウス)	生存数
PBS	0/5
マウス11E10 (8.7 $\mu$ g)	1/4*
マウス11E10 (6.45mg)	5/5
ヒト化11E10 (23.2 $\mu$ g)	0/5
ヒト化11E10 (232 $\mu$ g)	5/5

10.1および1.0mg/kgの間の保護的用量

\*死までの遅延平均時間、3.4日

【 0 0 8 4 】



本発明はまた、志賀毒素への曝露に関連する疾患および影響を治療し、軽減し、または予防する様々な方法を提供する。ヒトにおける陽性臨床応答がモノクローナル抗体を用いて得られており、当業者であれば、ヒトにおいて抗Stxヒト化モノクローナル抗体を使用する方法がわかるであろう (Fagerbergら, Cancer Research, 55:1824-27 (1995); Eur. J. Cancer, 2:261-267 (1995)を参照)。これらの疾患の治療のために患者に投与されるヒト化抗志賀毒素抗体の正確な用量は、典型的な臨床医により評価される因子によって変わるであろう。これらの因子は、(限定されるものでないが)、サイズ、年齢、全体の健康、感染の程度、および該患者に投与されている他の医薬を含む。正確な治療体制の開発には、医療業界の当事者に周知の日常的治療方法を通しての最適化が必要であろう。潜在的な患者群の例は、(限定されるものでないが)血液性下痢であるが便中に白血球のない幼児、HUSの徴候をもつ患者、志賀毒素に対して陽性の便サンプル試験を示す患者、ある事例に(受動の予防的処置として)関わりのある同胞または保育集団、および確認された事例に関わりのあった下痢(必ずしも血液性でない)を示す患者を含む。ヒト化13C4の約5mg/kg体重をヒト化11E10の約10mg/kg体重に組合わせた典型的な用量が意図されるであろう。この組合わせ製剤を患者に2回投与して、有効性を確保することができるであろう。ヒト化抗体の両方の型を含むことにより、患者は全ての型の志賀毒素に対して保護されるという保証を与える。

#### 【 0 0 8 5 】

当業者であれば、以上の開示に基づいて、本発明の使用および実施の方法を理解するであろう。本明細書に開示された本発明の明細と実施を考察すれば、当業者には、本発明の他の実施形態は明らかであろう。本明細および実施例は例とみなされるだけであり、本発明の真の範囲と精神は特許請求の範囲によって示されることを意図している。

#### 【 配 列 表 】

## SEQUENCE LISTING

<110> HENRY JACKSON FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF MILITARY  
MEDICINE

<120> HUMANIZED MONOCLONAL ANTIBODIES THAT PROTECT AGAINST  
SHIGA TOXIN INDUCED DISEASE

<130> 04995.0032-00304

<140>

<141>

<160> 44

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 1

att tca gcc cca gcc ggc cat ggc cga rgt rma gct ksa kga gwc 45

<210> 2

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 2

atttcaggcc cagccggcca tggccgargt ycarctkcar caryc 45

<210> 3  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide  
<400> 3  
atttcaggcc cagccggcca tggcccaggt gaagctksts gartc 45

<210> 4  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide  
<400> 4  
atttcaggcc cagccggcca tggccgargt xmagctksak gagwc 45

<210> 5  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide  
<400> 5  
atttcaggcc cagccggcca tggcccaggt bcarctkmar sartc 45

<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide  
<400> 6  
gaartavccc ttgaccaggc 20

<210> 7  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 7  
ggaggcggcg gttctgacat tgtgmtgwm cartc

35

<210> 8  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 8  
ggaggcggcg gttctgatrt tkygatgacb carrc

35

<210> 9  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 9  
ggaggcggcg gttctgayat ymagatgacm cagwc

35

<210> 10  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 10  
ggaggcggcg gttctsaat tgwktsacy cagtc

35

<210> 11  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 11  
ttcataggcg gccgcactag tagcmcgttt cagytccarc

40

<210> 12  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 12  
ttcataggcg gccgcactag tagcmcgttt katytccarc

40

<210> 13  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 13  
gcacctccag atgttaactg ctc

23

<210> 14  
<211> 49  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 14  
cttgatcgcg acagctacag gtgtccactc ccagggtgcag ctgcaggag

49

<210> 15  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 15  
ggtatggaat tctgaggaga ctgtgagagt ggtgcc

36

<210> 16  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 16  
ggttctgata tcgtgatgtc ccagtctcac aaattc

36

<210> 17  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 17  
gacatattcg aaaagtgtac ttacgtttca gctccagact gg

42

<210> 18  
<211> 366  
<212> DNA  
<213> *Shigella dysenteriae*

<400> 18  
caggtgcagc tgcaggagtc tggggctgag ctggtgaggt ctggggcctc agtgaggatg 60  
tcttgcaagg cttctggcta cacatttacc agttacaata tgcactgggt aaaacagaca 120

cctggacagg gcctggaatg gattggatat atttatcctg gaaatggtgg tactaactac 180  
 attcagaaat ttaagggcaa ggccatattg actgcagaca catcctccag cacagcctac 240  
 atgcagatca gcagtctgac atctgaagac tctgcggtct atttctgtac aagaagtccc 300  
 tctcactaca gtagtgaccc ctactttgac tactggggcc agggcaccac tctcacagtc 360  
 tcctca 366

<210> 19  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> *Shigella dysenteriae*

<400> 19  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ser Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Arg Met Ser Cys Asp Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Ile Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Ser Pro Ser His Tyr Ser Ser Asp Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 20  
 <211> 324  
 <212> DNA  
 <213> *Shigella dysenteriae*

<400> 20  
 gatattcgtga tgtcccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtcggaga cagggtcagc 60  
 atcacctgta aggccagcca ggaatgtgggt actgctgttg cctggatatca gcagaatcca 120  
 ggacaatctc ctaaatttct gatttactgg gcacccacac ggcacactgg agtccctgat 180  
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccattaccaa tgtgcagtct 240  
 gaagacttgg cagattatct ctgtcagcaa tatagcagtt atcctctcac gttcgggtgct 300  
 gggaccagtc tggagctgaa acgt 324

<210> 21  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Shigella dysenteriae*

<400> 21  
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Asn Pro Gly Gln Ser Pro Lys Phe Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Ser Leu Glu Leu Lys Arg  
 100 105



<210> 22  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 22  
atttcaggcc cagccggcca tggccgargt rmagctksak gagwc

45

<210> 23  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 23  
atttcaggcc cagccggcca tggccgargt ycarctkcar caryc

45

<210> 24  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 24  
atttcaggcc cagccggcca tggcccaggt gaagctksts gartc

45

<210> 25  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 25  
atttcaggcc cagccggcca tggccgavgt gmwgctkgtg gagwc

45

<210> 26  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 26  
atttcaggcc cagccggcca tggcccaggt bcarctkmar sartc

45

<210> 27  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 27  
gaartavccc ttgaccaggc

20

<210> 28  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 28  
gctgccaccg ccacctgmrg agacdgtgas tgarg

35

<210> 29  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 29  
gctgccaccg ccacctgmrg agacdgtgas mgtrg

35

<210> 30  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 30  
ggtgccaccg ccacctgmrg agacdgtgas cagrg

35

<210> 31  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 31  
ggaggcggcg gttctgacat tgtgmtgwm cartc

35

<210> 32  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 32  
ggaggcggcg gttctgatrt tkygatgacb carrc

35

<210> 33  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 33  
ggaggcggcg gttctgayat ymagatgacm cagwc

35

<210> 34  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 34  
ggaggcggcg gttctsaaat tgwktsacy cagtc

35

<210> 35  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 35  
ttcataggcg gccgcactag tagcmcgttt cagytccarc

40

<210> 36  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 36  
ttcataggcg gccgcactag tagcmcgttt katytccarc

40

<210> 37  
<211> 52  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Oligonucleotide

<400> 37  
atatactcgc gacagctaca ggtgtccact ccgaagtcca actgcaacag cc

52

<210> 38  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 Oligonucleotide

<400> 38  
 attaatgaat tctgcggaga cggtagaggt ggtc

34

<210> 39  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 Oligonucleotide

<400> 39  
 ttaaatagata tcgtgctgtc acaatctcc

29

<210> 40  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 Oligonucleotide

<400> 40  
 taatcggtcg aaaagtgtac ttacgtttca gttccagctt ggtcc

45

<210> 41  
 <211> 339  
 <212> DNA  
 <213> Shigella dysenteriae

<400> 41  
 gacattgtgc tgtcacaatc tccatcctcc ctagttgtgt cagttggaga gaagggttact 60  
 atgagctgca agtctagtca gagcctttta tatagtagaa atcaaaagaa ctacttgccc 120  
 tggtagaccgc agaaaccagg gcagtcctct aaagtgtgta ttactgggc atctactagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cctcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240  
 atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagttat 300  
 ccgctcacgt tccgtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339

<210> 42  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> *Shigella dysenteriae*

<400> 42  
 Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Val Val Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
 20 25 30  
 Arg Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln  
 35 40 45  
 Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60  
 Pro Asp Arg Leu Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 85 90 95  
 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu  
 100 105 110  
 Lys

<210> 43  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> *Shigella dysenteriae*

<400> 43  
 gaagtcacaac tgcaacagcc tggacctgag ctggagaagc ctggcgcttc agtgaaacta 60  
 tcttgcaagg cttctggtta ctctttcact gactacaaca tgaactgggt gaagcagaac 120

aatggagaga gccttgagtg gattggaaaa attgatcctt actatggtgg tcctagctac 180  
 aaccagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca agtcttcag cacagcctac 240  
 atgcagttca agagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtac aagaggggga 300  
 aatagggact ggtacttoga tgtgtggggc gcagggacca cgctcacgt ctccgca 357

<210> 44  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> *Shigella dysenteriae*

<400> 44  
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Lys Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Pro Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Phe Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Thr Arg Gly Gly Asn Arg Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly  
 100 105 110  
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ala  
 115

# 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

図 1 は、11E10および13C4抗体の双方の可変領域の遺伝子断片をクローニングするために用いられた一般的なクローニング戦略を示す。

## 【図 2】

図 2 は、13C4抗体の可変領域のPCR増幅に用いられたオリゴヌクレオチド配列を示す。

## 【図 3】

図 3 は、13C4抗体のH鎖およびL鎖の双方の可変領域のDNAおよびアミノ酸共通

配列を示す。該DNA共通配列は、ABI373配列決定装置により分析された増幅cDNAの自動化蛍光色素-ターミネーター配列反応を用いて決定された。CDRは、KabatおよびWu(Kabatら、(1991)、Sequences of Proteins of Immunological Interest, Vol. I、第5版、U.S. Department of Health and Human Services)による命名法に従い同定され、下記に位置する：

H鎖CDR (配列番号 19) :     CDR1-aa31-35  
                                  CDR2-aa50-66  
                                  CDR3-aa99-111  
L鎖CDR (配列番号 21) :     CDR1-aa24-34  
                                  CDR2-aa50-56  
                                  CDR3-aa89-97

【図 4】

図 4 は、13C4抗体の可変領域を含む、哺乳動物発現ベクターtkMC249Aを構築するための戦略を示す。

【図 5】

図 5 は、11E10抗体の可変領域のPCR増幅に用いられたオリゴヌクレオチドを示す。

【図 6】

図 6 は、11E10抗体のH鎖およびL鎖の双方の可変領域のDNAおよびアミノ酸共通配列を示す。該DNA共通配列は、ABI373配列決定装置により分析された増幅cDNAの自動化蛍光色素-ターミネーター配列反応を用いて決定された。CDRは、KabatおよびWu(KabatおよびWu、上記)による命名法に従い同定され、下記に位置する：

H鎖CDR (配列番号 44) :     CDR1-aa31-35  
                                  CDR2-aa50-66  
                                  CDR3-aa99-108  
L鎖CDR (配列番号 42) :     CDR1-aa24-40  
                                  CDR2-aa56-62  
                                  CDR3-aa95-103



## 【図 7】

11E10抗体の可変領域を含む、哺乳動物発現ベクターpACE4を構築するための戦略を示す。

## 【図 8】

図 8 は、抗Stx1 13C4抗体産生のELISAを示し、H13C4細胞系が、ヒトIgGおよび $\kappa$ 定常ドメインからなる抗体を産生することを実証する。

## 【図 9】

図 9 は、抗Stx1 13C4毒素結合活性のELISAを示し、H13C4細胞系により産生された該抗体がStx1毒素に結合することを実証する。

## 【図 10】

図 10 は、抗Stx2 11E10抗体産生のELISAを示し、H11E10細胞系が、ヒトIgGおよび $\kappa$ 定常ドメインからなる抗体を産生することを実証する。

## 【図 11】

図 11 は、抗Stx2 11E10毒素結合活性のELISAを示し、H11E10細胞系により産生された該抗体がStx2毒素に結合することを実証する。

## 【図 12】

図 12 は、プラスミドpCDNA3mut.LCPL.LCVKを構築するための戦略を示す。

## 【図 13】

図 13 は、プラスミドpCDNA3mut.HCPL.HCV2bを構築するための戦略を示す。

## 【図 14】

図 14 は、プラスミドpSUN9およびpSUN9:kappaを構築するための戦略を示す。

## 【図 15】

図 15 は、プラスミドpSUN10およびpSUN10:IgG1を構築するための戦略を示す。

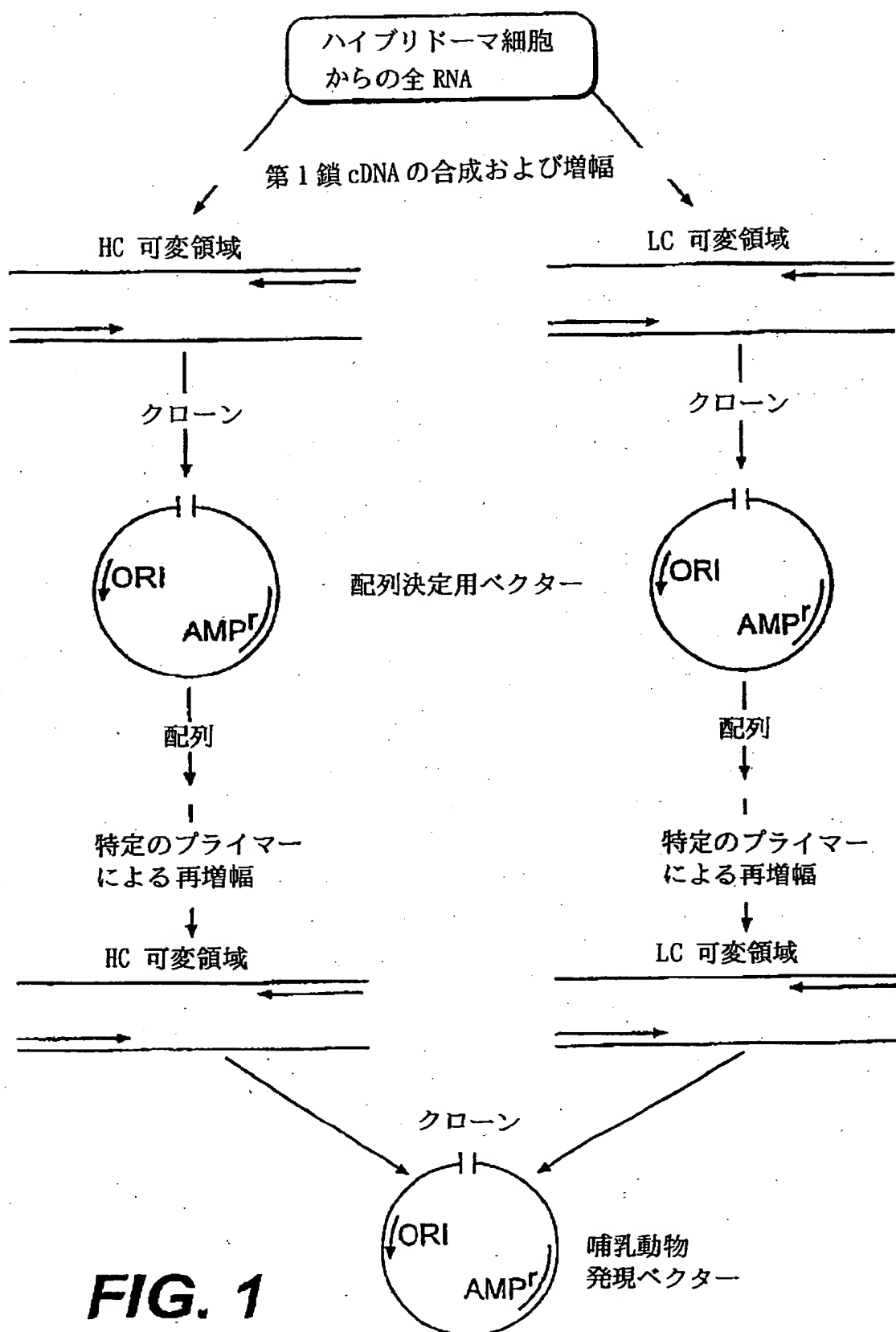
## 【図 16】

図 16 は、プラスミドpJRS311を構築するための戦略を示す。

## 【図 17】

図 17 は、プラスミドpJRS315を構築するための戦略を示す。

【 図 1 】

**FIG. 1**

## 【図2A】

## マウスH鎖「フロント」プライマー

JSS1

5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGARGTRMAGCTKSAKGAGWC-3' 配列番号 1

JSS2

5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGARGTYCARCTKCARCARYC-3' 配列番号 2

JSS3

5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGTGAAGCTKSTSGARTC-3' 配列番号 3

JSS4

5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAVGTGMWGCTKGTGGAGWC-3' 配列番号 4

JSS8

5'-ATTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTBCARCTKMARSARTC-3' 配列番号 5

## マウスH鎖「バック」プライマー

JS300

5'-GAARTAVCCCTTGACCAGGC-3' 配列番号 6

## マウスL鎖リーダー「フロント」プライマー

JSS009

5'-GGAGGCGCGGTTCTGACATTGTGMTGNCMCARTC-3' 配列番号 7

JSS010

5'-GGAGGCGCGGTTCTGATRTTKYGATGACBCARRC-3' 配列番号 8

JSS011

5'-GGAGGCGCGGTTCTGAYATYMAGATGACMCAGWC-3' 配列番号 9

JSS012

5'-GGAGGCGCGGTTCTSAATTGKCTSACYCAGTC-3' 配列番号 10

**FIG. 2A**

## 【 図 2 B 】

## マウス L 鎖「バック」プライマー

JS153

5'-TTCATAGGCGGCCGCACTAGTAGCMCGTTCAGYTCCARC-3'

配列番号 11

JS154

5'-TTCATAGGCGGCCGCACTAGTAGCMCGTTKATYTCCARC-3'

配列番号 12

OKA57

5'-GCACCTCCAGATGTTAACTGCTC-3'

配列番号 13

## 「13C4」特異的プライマー

OKA144

5'-CTTGATCGCGACAGCTACAGGTGTCCACTCCAGGTGCAGCTGCAGGAG-3' 配列番号 14

OKA143

5'-GGTATGGAATTCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCC-3'

配列番号 15

OKA145

5'-GGTTCTGATATCGTGATGTCCAGTCTCACAAATTC-3'

配列番号 16

OKA146

5'-GACATATTCGAAAGTGACTTACGTTTCAGCTCCAGACTGG-3'

配列番号 17

**FIG. 2B**

[ 図 3 ]

13C4 抗 STX1 H 鎖可変領域

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGTCTGGGGCTCAGTGAGGATG  
 Q V Q L Q E S G A E L V R S G A S V R M  
 TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTTACCACTTACAATATGCACTGGGTAAAACAGACA  
 S C D A S G Y T F T S Y N M H W V K Q T  
 CCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGATATATTTATCCTGGAATGGTGGTACTAATAC  
 P G Q G L E W I G Y I Y P G N G G T N Y  
 ATTCAGAAATTTAAGGGCAAGGCCATATTGACTGCAGACACATCCTCCAGCACAGCCTAC  
I Q K F K G K A I L T A D T S S S T A Y  
 ATGCAGATCAGCAGTCTGACATCTGAAGACTCTGCGGTCTATTTCTGTACAAGAAGTCCCTCT  
 M Q I S S L T S E D S A V Y F C T R S P S  
 CACTACAGTAGTGACCCCTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA  
H Y S S D P Y F D Y W G Q G T T L T V S S

配列番号 18

配列番号 19

13C4 抗 STX1 L 鎖可変領域

GATATCGTGATGTCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTCCGAGACAGGGTCAGCATC  
 D I V M S Q S H K F M S T S V G D R V S I  
 ACCTGTAAGGCCAGCCAGGATGIGGGTACTGCTGTTGCCTGGTATCAGCAGAATCCAGGACAA  
 T C K A S Q D V G T A V A W Y Q Q N P G Q  
 TCTCCTAAATTTCTGATTTACTGGGCATCCACACGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACA  
 S P K F L I Y W A S T R H T G V P D R F T  
 GGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATTACCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCA  
 G S G S G T D F T L T I T N V Q S E D L A  
 GATTATTTCTGTCAGCAATATAGCAGTTATCCTCTCACGTTCCGGTCTGGGACCAGTCTGGAG  
D Y F C Q Q Y S S Y P L T F G A G T S L E  
 CTGAAACGT  
 L K R

配列番号 20

配列番号 21

**FIG. 3**

【 图 4 】

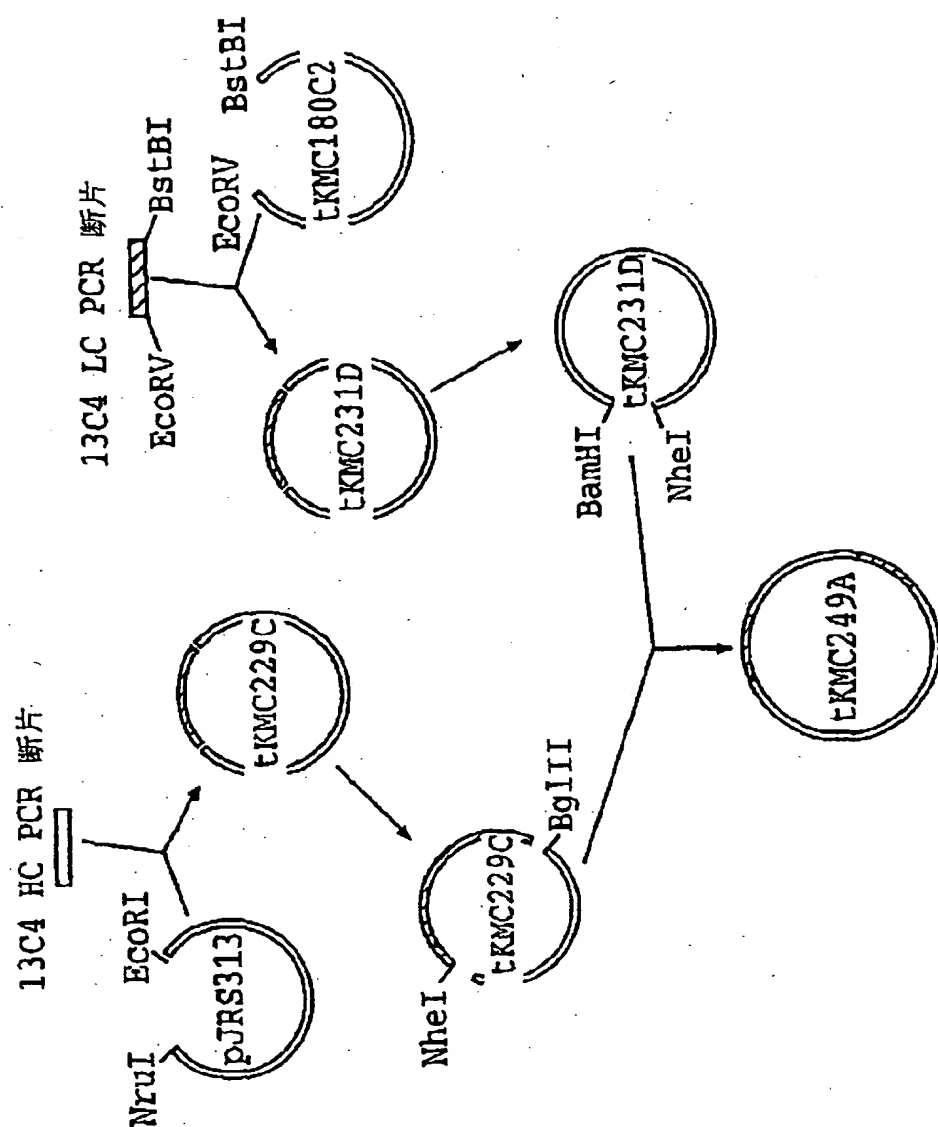


FIG. 4

## 【図5A】

## マウスH鎖「フロント」プライマー

JS001

5'-ATTTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGARGTRMAGCTKSAKGAGWC-3'

配列番号 22

JS002

5'-ATTTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGARGTYCARCTKCARCARYC-3'

配列番号 23

JS003

5'-ATTTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGTGAAGCTKSTSGARTC-3'

配列番号 24

JS004

5'-ATTTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAVGTGMWCTKGTGGAGWC-3'

配列番号 25

JA008

5'-ATTTTCAGGCCCAGCCGGCCATGGCCAGGTBCARCTKMARSARTC-3'

配列番号 26

## マウスH鎖「バック」プライマー

JS300 5'-GAARTAVCCCTTGACCAGGC-3'

配列番号 27

JS160 5'-GCTGCCACCGCCACCTGMRGAGACDGTGASTGARG-3'

配列番号 28

JS161 5'-GCTGCCACCGCCACCTGMRGAGACDGTGASMGTRG-3'

配列番号 29

JS162 5'-GCTGCCACCGCCACCTGMRGAGACDGTGASCAGRG-3'

配列番号 30

## マウスL鎖リーダー「フロント」プライマー

JS009 5'-GGAGGCGCGGTTCTGACATTGTGTMGCMCARTC-3'

配列番号 31

JS010 5'-GGAGGCGCGGTTCTGATRTTKYGATGACBCARRC-3'

配列番号 32

JS011 5'-GGAGGCGCGGTTCTGAYATYAGATGACMCAGWC-3'

配列番号 33

JS012 5'-GGAGGCGCGGTTCTSAATTGWKCTSACYCAGTC-3'

配列番号 34

FIG. 5A

【図5B】

マウスL鎖「バック」プライマー

JS153 5'-TTCATAGCGCGCCGCACTAGTAGCMCGTTTCAGYTCCARC-3' 配列番号 35  
JS154 5'-TTCATAGCGCGCCGCACTAGTAGCMCGTTTKATYTCCARC-3' 配列番号 36

「11E10」特異的プライマー

11E10HF 配列番号 37  
5'-ATATACTCGCGACAGCTACAGGTGTCCACTCCGAAGTCCAACAGCC-3'  
11E10HB 配列番号 38  
5'-ATTAATGAATTCTGCGGAGACGGTGAGAGTGGTC-3'  
11E10LF 配列番号 39  
5'-TTAAATGATATCGTGCTGTCACAATCTCC-3'  
11E10LB 配列番号 40  
5'-TAATCGTTCGAAAAGTGACTTACGTTTCAGTTCCAGCTTGGTCC-3'

**FIG. 5B**



[ 図 6 A ]

11E10		7/23/97 12:38 PM										二重下線 = CDRS		配列番号 41-42											
	L 鎖	10	20	30	40	50	60	70	80																
21	11E10	GACATTGTC TGTACAAATC TCCATCCTCC CTAGTTGTGT CAGTTGGAGA GAAGGTACT ATGAGCTGCA AGTCTAGTCA																							
27		D I V L S Q S P S S L V V S V G E K V T M S C K S S Q																							
		90	100	110	120	130	140	150	160																
21	11E10	GAGCCCTTTA TATAGTAGAA ATCRAAGAA CTACTTGGCC TGGTACGAGC AGAACCCAGG GCAGTCTCCT AAAGTCTGCA																							
27		S L L Y S R N Q K N Y L A W Y Q Q K P G Q S R K V L																							
		170	180	190	200	210	220	230	240																
21	11E10	TTTACTGGCC ATCTACTAGG GAATCTGGG TCCCTGATCG CCTCAGAGC AGTGGATCTG GGACAGATTT CACTCTCACC																							
27		I Y W A S T R E S G V P D R L T G S G S G T D P T L T																							
		250	260	270	280	290	300	310	320																
21	11E10	ATCAGCAGTG TGAAGGCTGA AGACTUGGA GTTTATTACT GTACAGCAATA TTATAGTTAT CCGCTCAGCT TCGGTCTGCG																							
27		I S S V K A E D L A V Y Y C Q Q Y Y S Y P L T F G A G																							
		330	340	350	360	370	380	390	400																
21	11E10	GACCAAGCTG GAGCTGAAA																							
27		T K L E L K																							

FIG. 6A

11E10 H 鎖		7/23/97 12:36 PM		二重下線 = CDRs		配列番号 43-44			
		10	20	30	40	50	60	70	80
1 11E10		GAAGTCCAAC TGCACACAGC TGGACCTGAG CTGGAGAGC CTGGCGCTTC AGTGAACATA TCCTGCAAGG CTTCGTGGTAA							
11		E V Q L Q Q P G P E L E K P G A S V K L S C K A S G Y							
		90	100	110	120	130	140	150	160
1 11E10		CTCTTTTCACT GACTACAACA TGAACCTGGT GAAGCAGAAC AATGGAGAGA GCCTTGAGTG GATTGGAAAA ATTGATTCCTT							
11		<u>S P T D Y N M N W V K Q N N G E S L E W I G K I D P</u>							
		170	180	190	200	210	220	230	240
1 11E10		ACTATGGTGG TCCTAGCTAC AACCAGAGCT TCAAGGACAA GGCCACATTG ACTGTAGACA AGTCTTCCAG CACAGCCTAC							
11		<u>Y Y G G P S Y N Q K F K D K A T L T V D K S S S T A Y</u>							
		250	260	270	280	290	300	310	320
1 11E10		ATGCAGTTCA AGAGCCTGAC ATCTGAGGAC TCTGCAGTCT ATTACTGTAC AAGAGGGGCA AATAGGGACT GGTACTTCGA							
11		<u>M Q F K S L T S E D S A V Y Y C T R G G N R D W Y F D</u>							
		330	340	350	360	370	380	390	400
1 11E10		TGTGTGGGGC GCAGGACCA CGTCACCGT CTCGGCA							

FIG. 6B

【 图 7 】

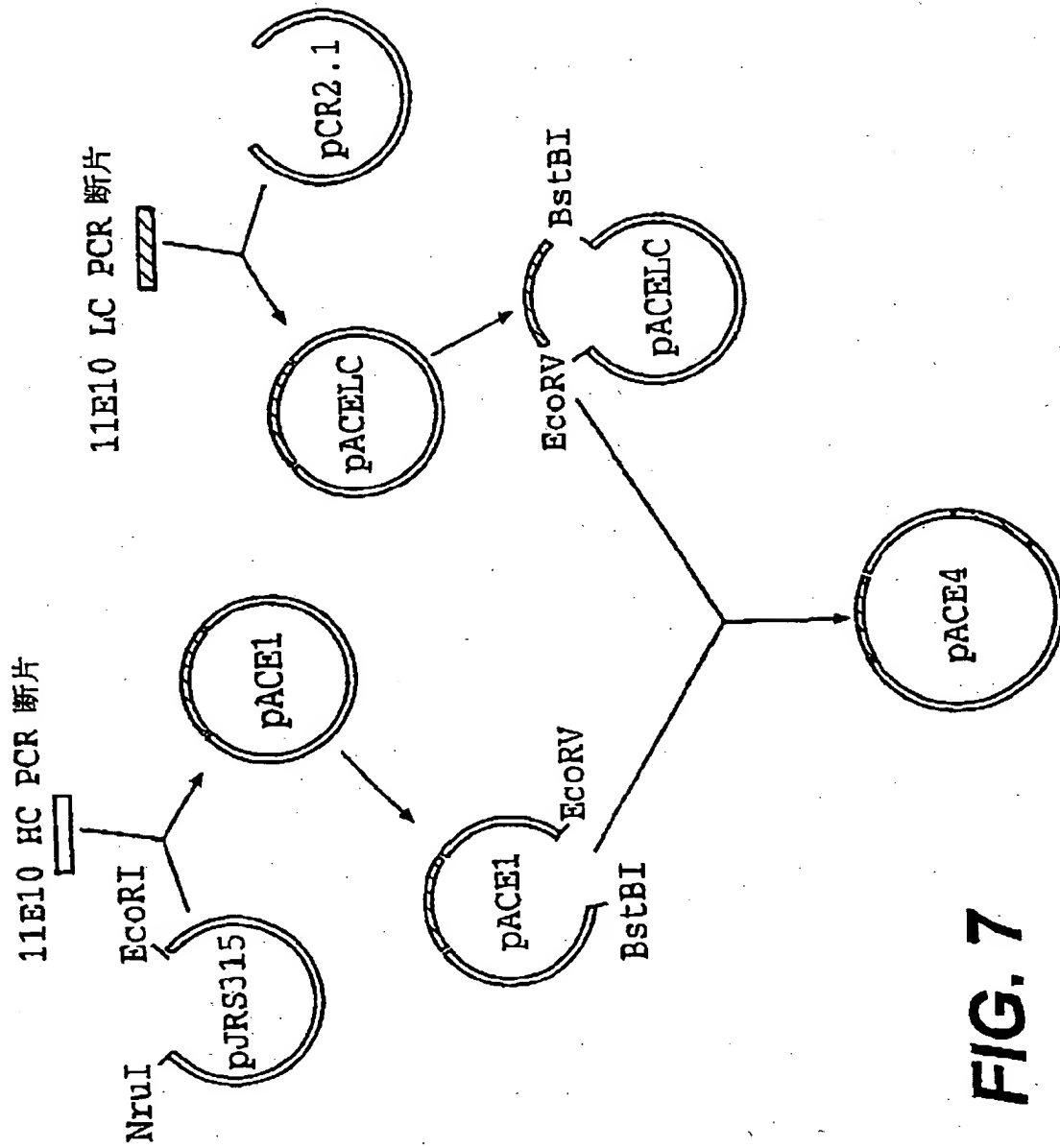


FIG. 7

【 図 8 】

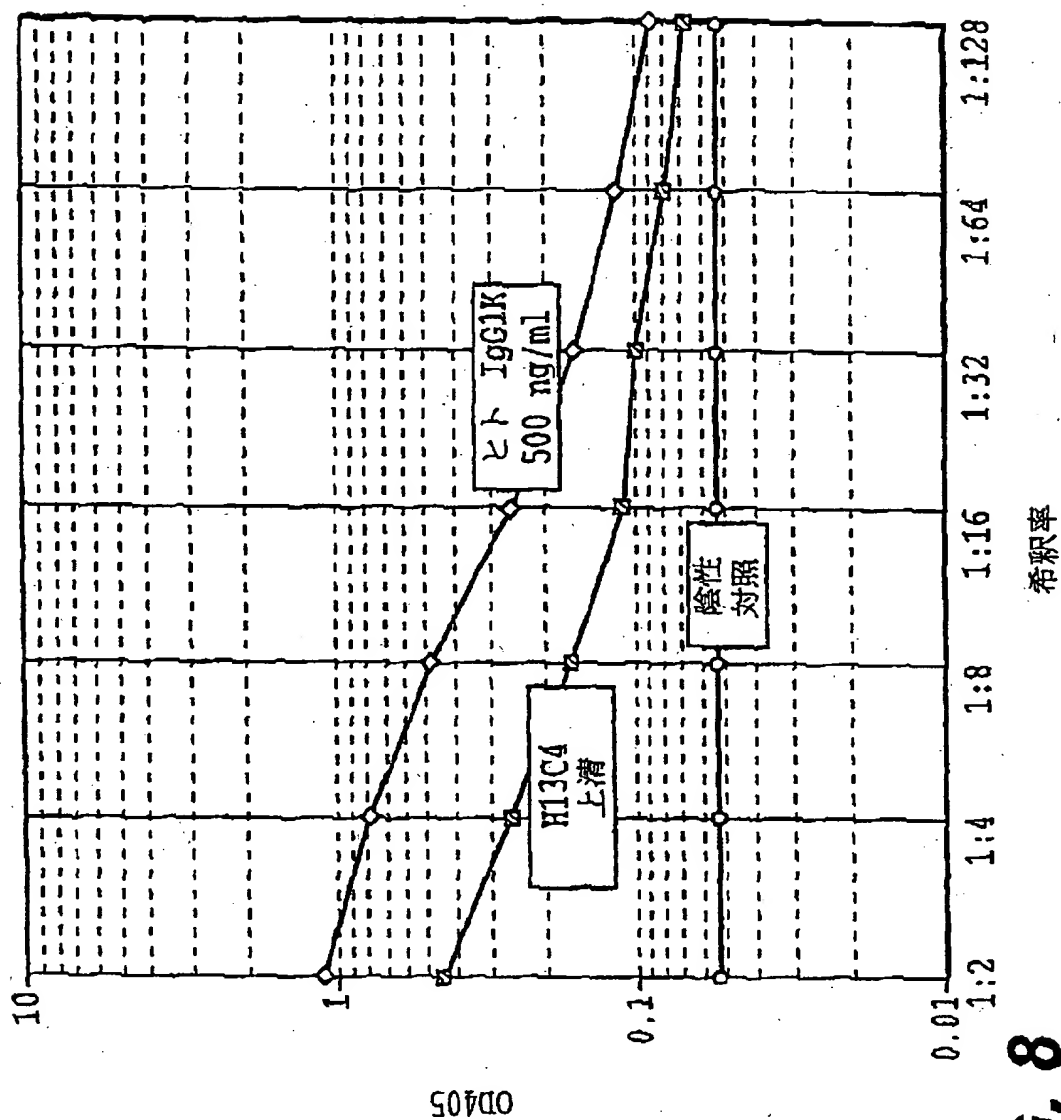
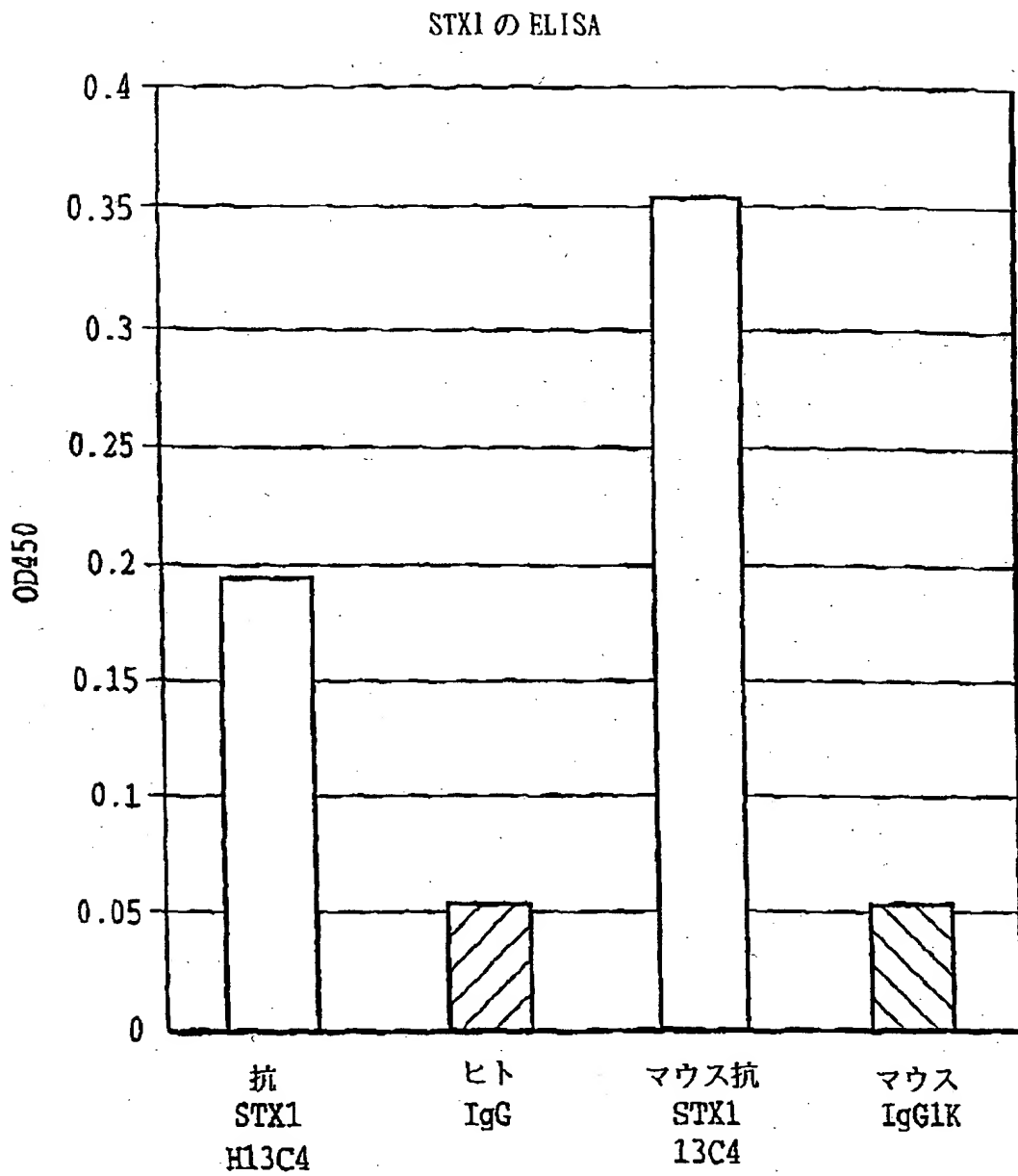


FIG. 8

【 図 9 】

**FIG. 9**

【図 10】

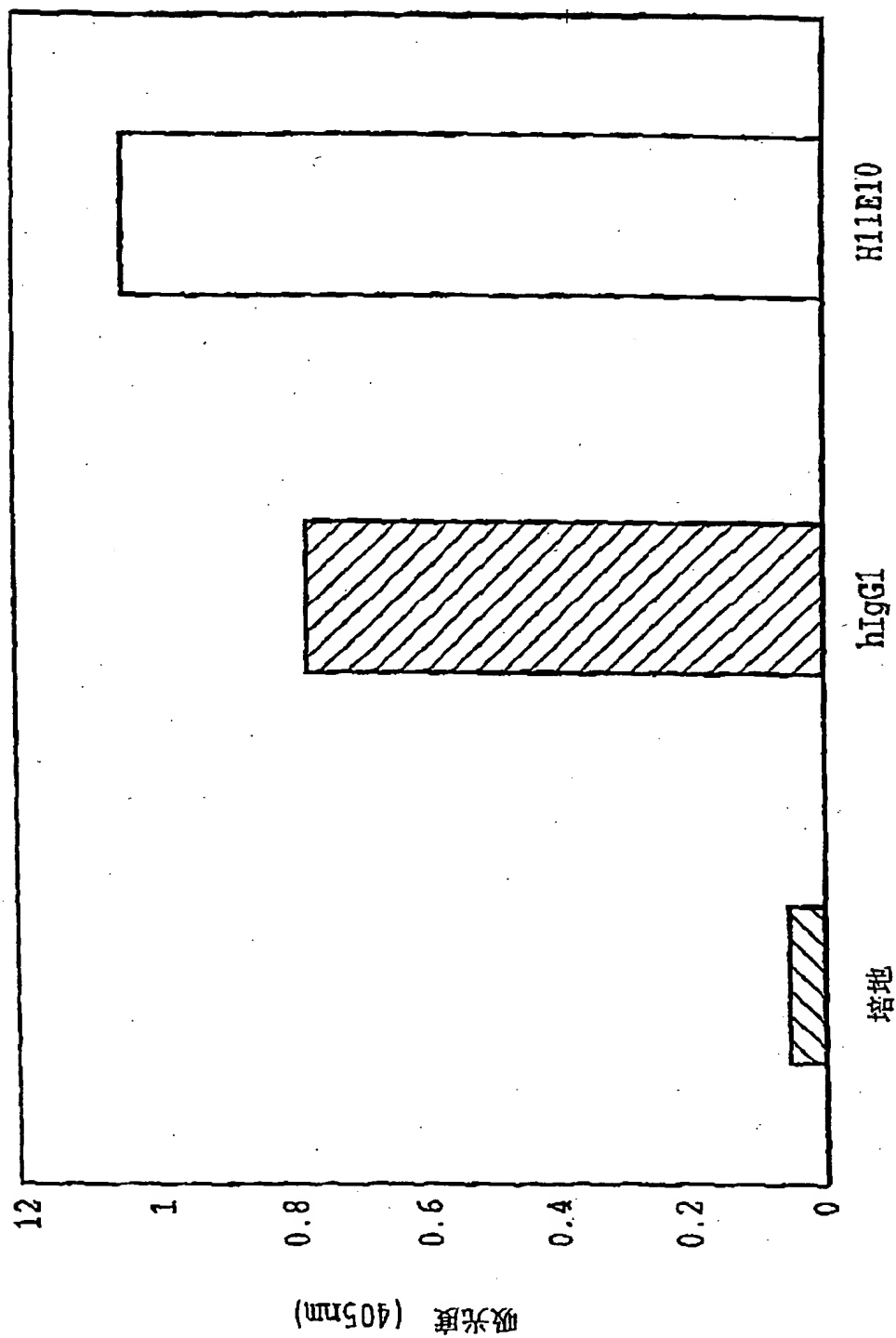


FIG. 10

【 図 1 1 】

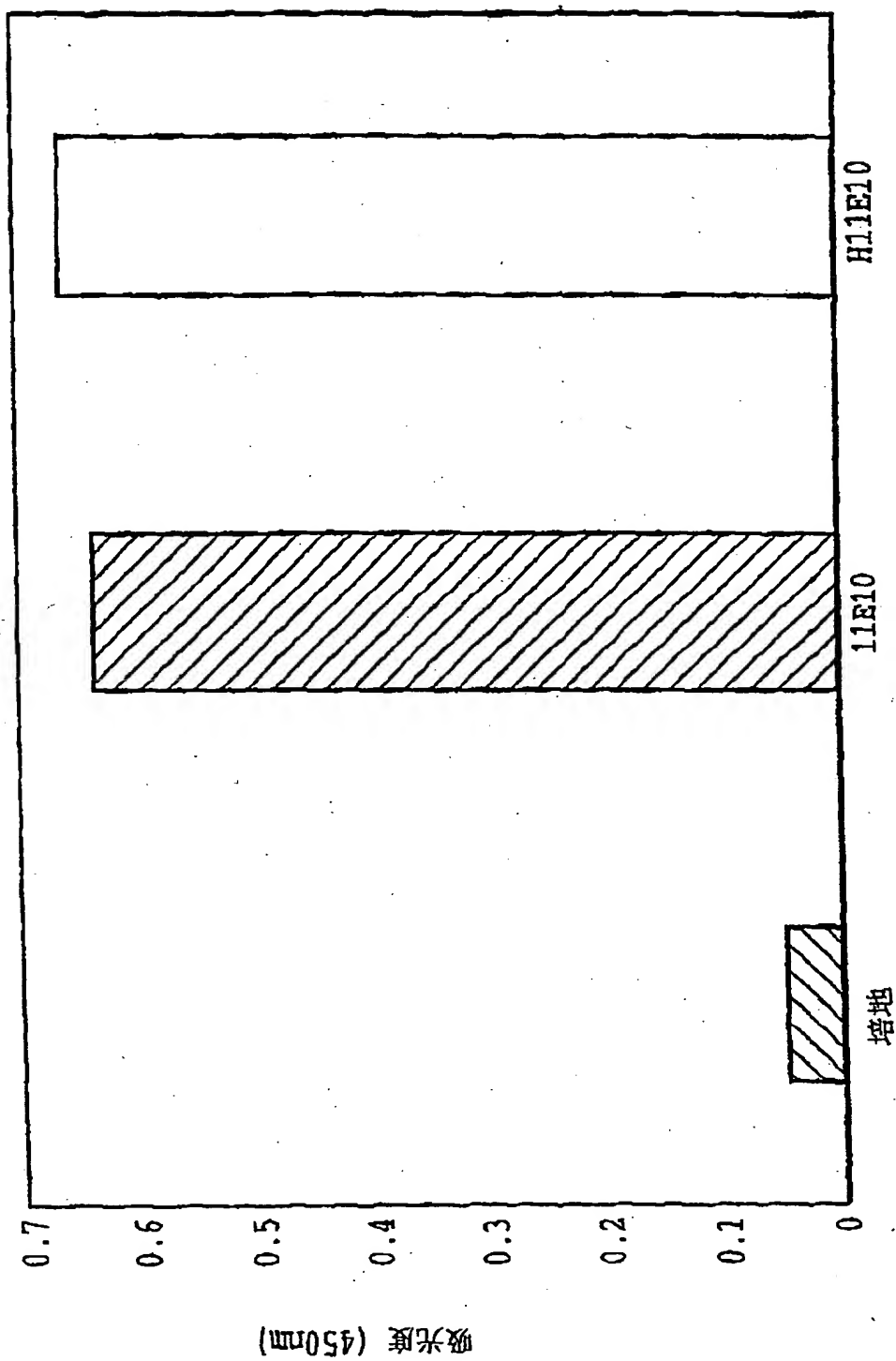


FIG. 11

【 図 1 2 】

pCDNA3mut.LCPL.LCVK

構築：

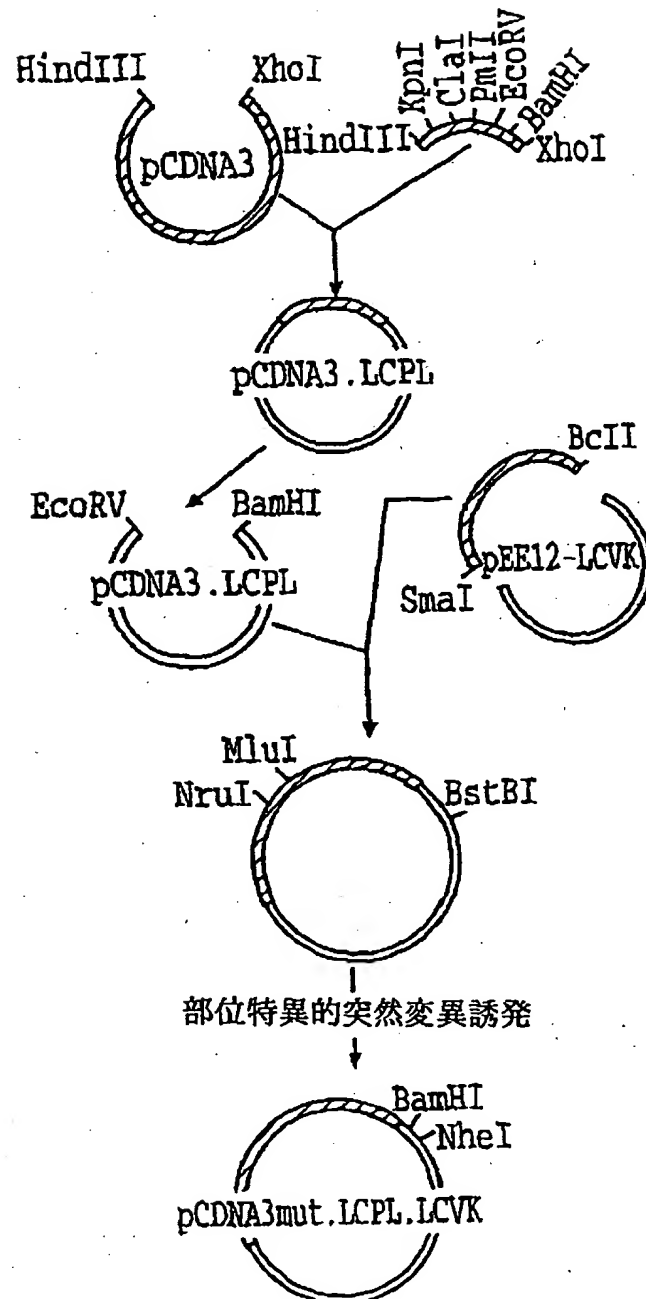


FIG. 12



【 図 1 3 】

pCDNA3mut.HCPL.HCV2b

構築：

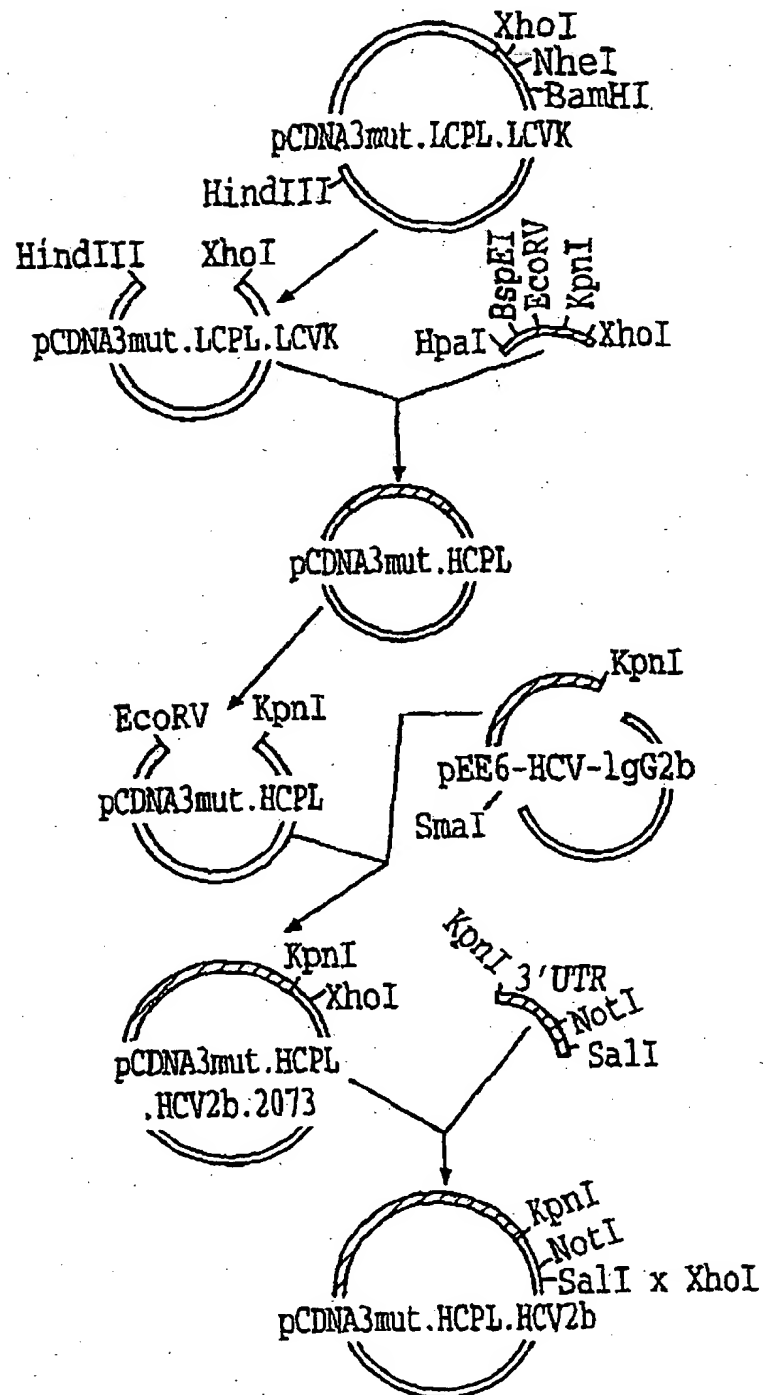
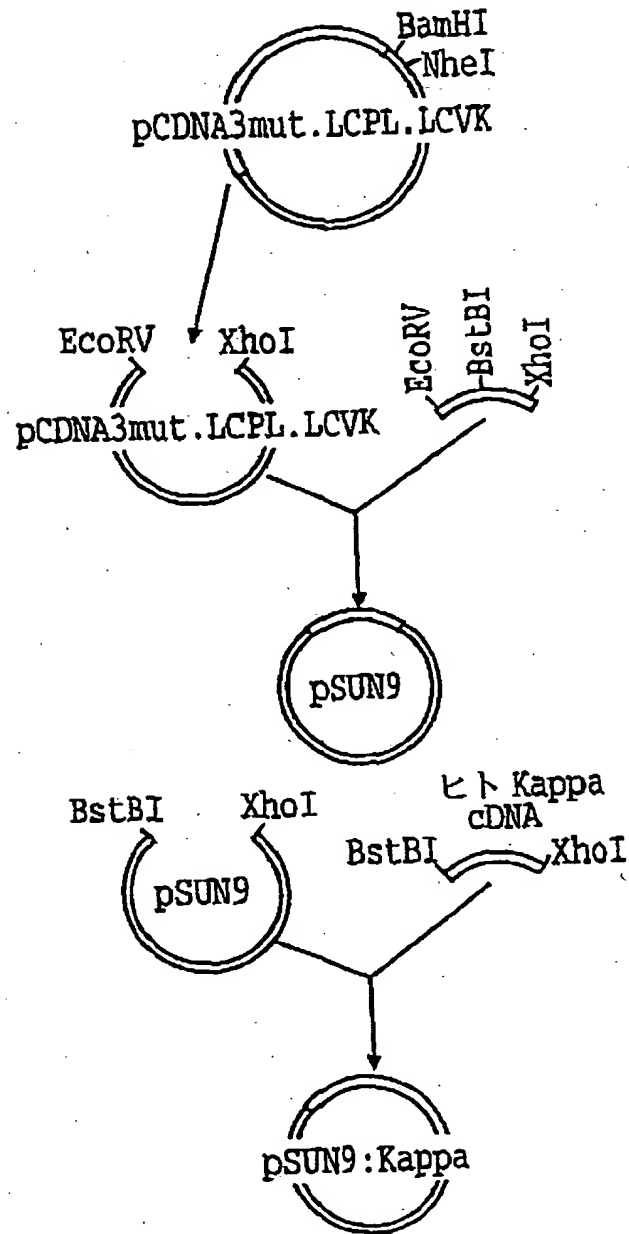


FIG. 13

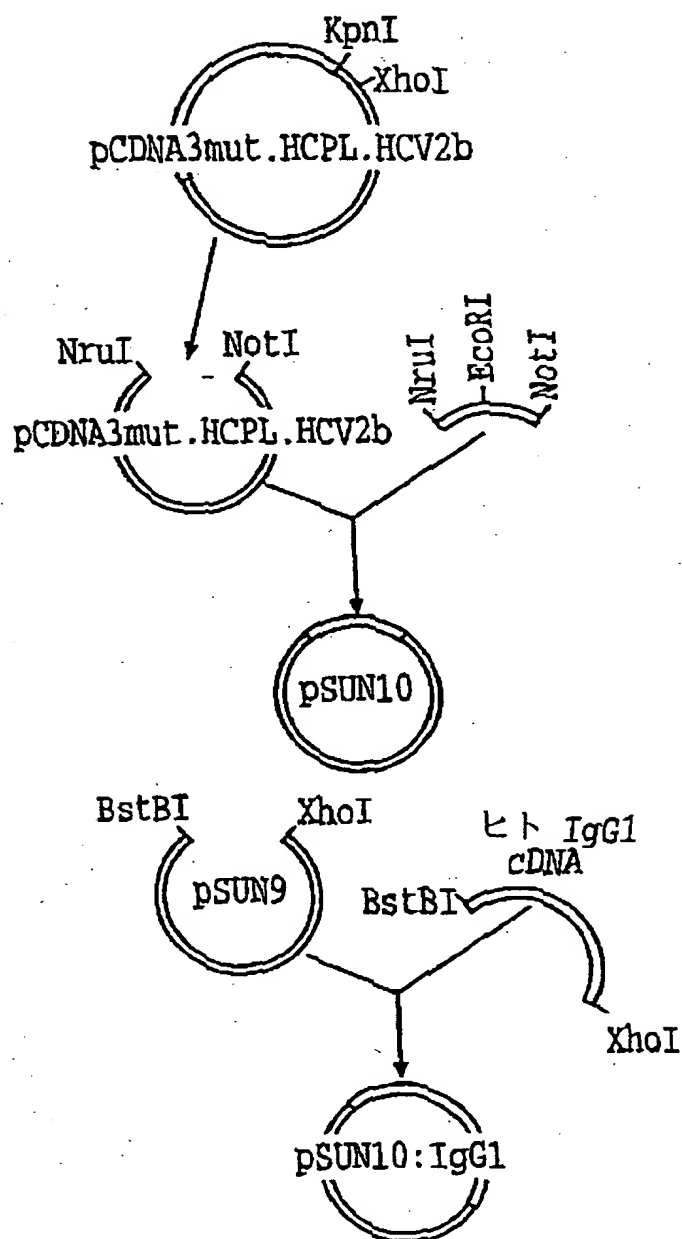
【 図 1 4 】

pSUN9,9:Kappa 構築 :

**FIG. 14**

【 図 1 5 】

pSUN10, 10:IgG1 構築 :

**FIG. 15**

【 図 1 6 】

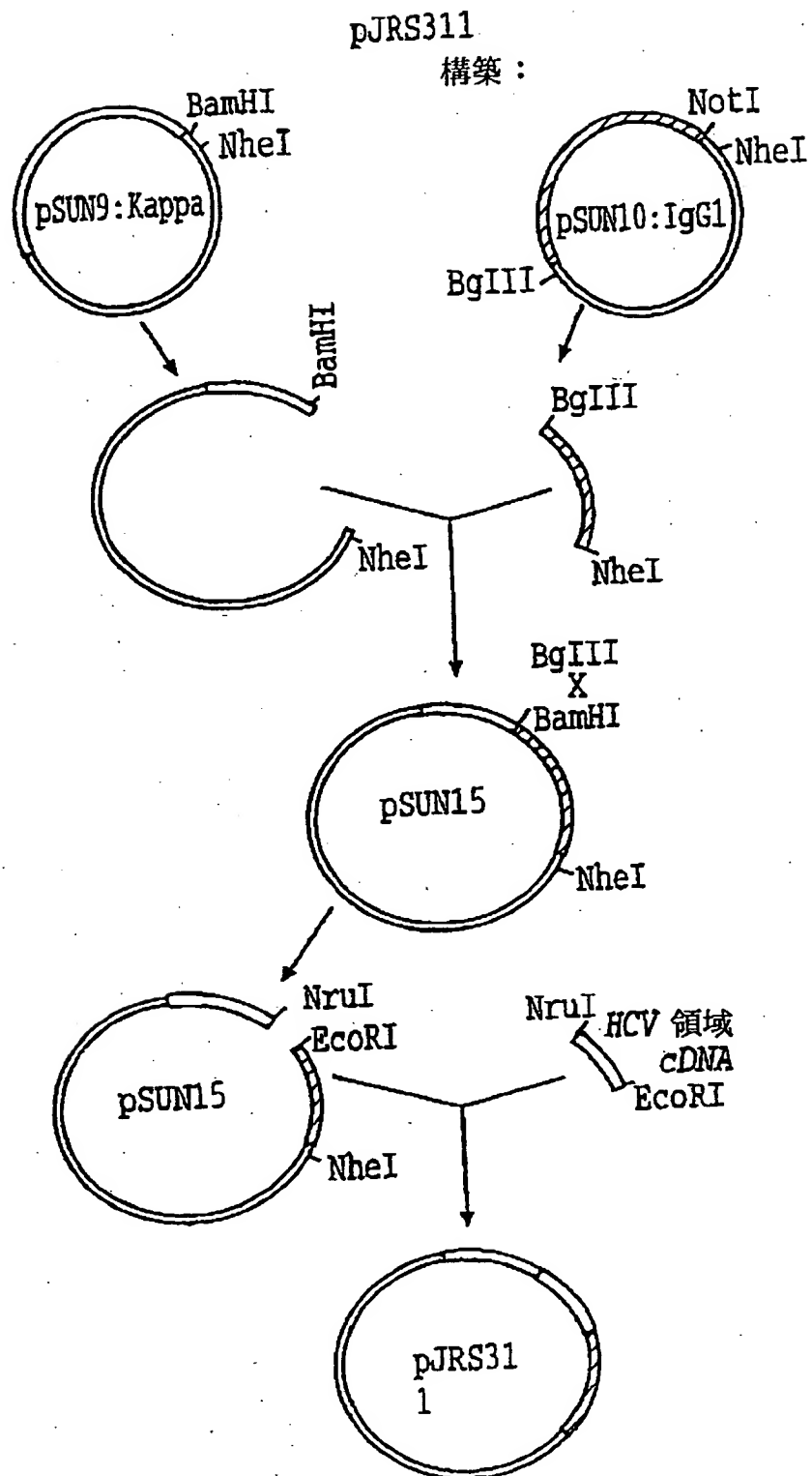
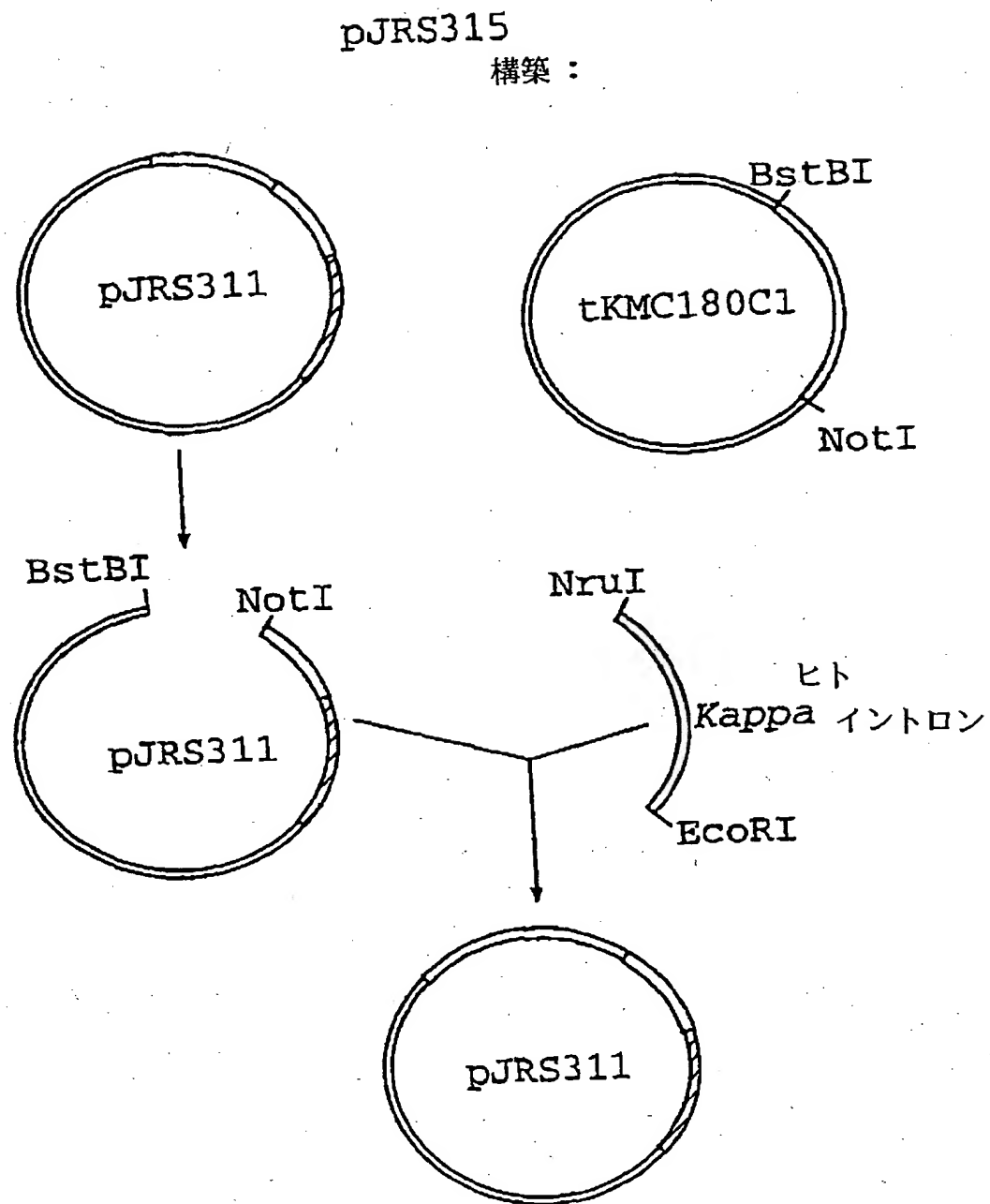


FIG. 16

【図17】

**FIG. 17**

## [ 国际調査報告 ]

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No. PCT/US 98/27267	
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N15/85 C07K16/12 C07K16/46 C12N5/10 A61K39/40	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
Y	H. RÜSSMANN ET AL.: "Variants of Shiga-like toxin II constitute a major toxin component in Escherichia coli 0157 strains from patients with haemolytic uraemic syndrome." JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY, vol. 40, no. 5, May 1994, pages 338-343, XP002100300 London, GB see the whole document --- -/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.	
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 19 Apr11 1999	Date of mailing of the international search report 06/05/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5018 Patentamt 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Noo1J, F

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.

PCT/US 98/27267

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	A. LOBUGLIO ET AL.: "Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: Kinetics and immune response." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE U.S.A., vol. 86, June 1989, pages 4220-4224, XP002100301 Washington, DC, USA cited in the application see abstract	1-31
A	J. SPEIRS ET AL.: "Detection of Escherichia coli cytotoxins by enzyme-linked immunosorbent assays." CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 37, no. 8, August 1991, pages 650-653, XP002100302 Ottawa, Canada see abstract	1-31
A	EP 0 239 400 A (G. WINTER) 30 September 1987 see examples see claims	1-31
P, X	WO 98 20903 A (TRUSTEES OF TUFTS COLLEGE) 22 May 1998  see examples see claims	1, 3, 4, 6-8, 13, 14, 16-18, 23-31

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 98/27267

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 24, 25, 27, 28, 30, 31  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Remark: Although claim(s) 24, 25, 27, 28, 30, 31  
is(are) directed to a method of treatment of the human/animal  
body, the search has been carried out and based on the alleged  
effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such  
an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all  
searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment  
of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report  
covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is  
restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 98/27267

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 239400 A	30-09-1987	AT 109508 T	15-08-1994
		DE 3750304 D	08-09-1994
		DE 3750304 T	22-12-1994
		ES 2056814 T	16-10-1994
		GB 2188638 A, B	07-10-1987
		JP 62296890 A	24-12-1987
		US 5225539 A	06-07-1993
WO 9820903 A	22-05-1998	NONE	

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
A 6 1 P 31/04		C 0 7 K 16/12	
C 0 7 K 16/12		16/46	
16/46		C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15		1/19	
1/19		1/21	
1/21		C 1 2 P 21/08	
5/10		C 1 2 N 15/00	Z N A A
15/02		5/00	B
C 1 2 P 21/08			A
		15/00	C

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, J P

(71) 出願人 メルトン-セルサ, アンジェラ  
アメリカ合衆国 20165 ヴァージニア州,  
スターリング, ブランディーウィン コー  
ト 20516

(72) 発明者 スティンソン, ジェフリー, エル.  
アメリカ合衆国 33331 フロリダ州, ダ  
ヴィー, ダーハム レーン 15030

(72) 発明者 ウォン, ヒング  
アメリカ合衆国 33332 フロリダ州, ウ  
エストン, ウェントワース 2966

(72) 発明者 オブライエン, アリソン, ディー.  
アメリカ合衆国 20817 メリーランド州,  
ベテスダ, チャールコート ロード 5514

(72) 発明者 シュミット, クレア, ケー.  
アメリカ合衆国 20853 メリーランド州,  
ロックビル, グラスゴー ドライブ 4616

(72) 発明者 メルトン-セルサ, アンジェラ  
アメリカ合衆国 20165 ヴァージニア州,  
スターリング, ブランディーウィン コー  
ト 20516

F ターム (参考) 4B024 AA01 BA43 BA44 CA04 CA11  
DA02 DA06 EA04 FA02 GA03  
GA14  
4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24  
DA01  
4B065 AA26X AA90X AA91X AA93Y  
AB01 AB05 BA03 CA25 CA44  
4C085 AA14 AA16 BA21 BA41 BB33  
BB36 BB37 CC24 DD62 EE01  
GG01  
4H045 AA11 AA30 BA10 DA76 DA83  
FA70 FA74